

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
SEP 26 1955

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

- J. A. V. BUTLER: Effects of Ultra-Violet Light on Nucleic Acid and Nucleoproteins and Other Biological Systems 289
H. P. WOLVEKAMP: Die physikalische Kieme der Wasserinsekten. 294

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

- E. WENKERT and LIANG H. LIU: The Constitution of the Alloyohimbanes. 302
C. F. HUEBNER, H. B. MACPHILLAMY, E. SCHLITTLER, and A. F. St. ANDRÉ: Rauwolfia Alkaloids XXI. The Stereochemistry of Reserpine and Deserpidine. 303
F. KÖRÖSY: Heats of Neutralization of Fructose-1,6-diphosphate. 305
E. KELLENBERGER: Les transformations des nucléoides de *Escherichia coli* déclenchées par les rayons X. 305
F. WINDISCH, St. HINKELMANN und D. STIERAND: Histochemischer Nachweis der im Zytoplasma regenerativ nach P-Mangelzüchtung auftretenden phosphatischen Überkompensation. 307
P. E. LINDAHL and K. M. LINDAHL: On the Concentration of Eosinophile Leucocytes. 310
GY. FEKETE: The Effect of Protamine on the Action of ACTH. 310
A. CERLETTI und B. BERDE: Die Wirkung von D-Lysergsäure-diäthylamid (LSD 25) und 5-Oxytryptamin auf die Chromatophoren von *Poecilia reticulatus*. 312
W. SANDRITTER und J. HARTLEIB: Quantitative Untersuchungen über den Nukleinsäureverlust des Gewebes bei Fixierung und Einbettung. 313
R. E. HAGENBACH und H. GYSIN: Über 6-(4'-Pyridyl)-3-mercapto-1,2,4-triazin-5-on. 314
P. CORREALE: Colorimetric and Spectrophotometric Titration of 5-Hydroxyindoleacetic Acid. 315
AGNETE SNOG-KJAER, INGE PRANGE, and H. DAM: On the Formation of Coprosterol in the Intestine. 316
L. ROBERT: Dosage de la procainestérase sérique par spectrophotométrie différentielle. 316
S. ČMELÍK: Agglutininbildung durch verschiedene Proteinfractionen von *Salmonella ballerup*. 317
W. BOLLAG und H. R. MARTI: Aktive und passive Immunisierung gegen heterologe Tumoren. 318
H. LEMCHE: Neurosecretion and Incretory Glands in a Tectibranch Mollusc. 320
F. ANDERS: Zytologische Untersuchungen an der Reblaus-Blattgalle. 322
J. SCHWARTZKOPFF: Die Grössenabhängigkeit der Herzfrequenz von Krebsen im Vergleich zu anderen Tiergruppen. 323
H. HENSEL: Über die Funktion der Lorenzinischen Ampullen der Selachier. 325
O. KUHN, J. SCHULZE und D. SPIEKER: Untersuchungen über die Ursache der galvanotaktischen Reaktionen bei Fischen. 327
S. DIJKGRAAF: Die Augenstielbewegungen der Languste (*Palinurus vulgaris*) (Disputandum). 329
S. DIJKGRAAF: Lauterzeugung und Schallwahrnehmung bei der Languste (*Palinurus vulgaris*). 330

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

- Biomathematics, the Principles of Mathematics for Students of Biological Science. By Cedric A. B. Smith (Charles Griffin & Co., Ltd., London, 1954) (Ref. A. Linder) 332
Lehrbuch der Pädiatrie. Von G. Fanconi und A. Wallgren (Verlag Benno Schwabe & Co., Basel 1954) (Ref. E. Berger) 332

Corrigendum 332

EXPERIENTIA



L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications*;
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées*.

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienenen *Bücher*, durch Referate über *Kongresse und Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPER.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 36.- pour la Suisse; pour l'étranger fr. 46.-. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $\frac{1}{2}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ page fr. 77.-. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser, Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15
Tél. 249800; adresse télégraphique: Edita Bâle

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.-, im Ausland sFr. 46.-.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 x 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ Seite Fr. 77.-; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15
Tel. 249 00; Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni*;
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports*;
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.- per la Svizzera; all'estero fr. 46.-. I prezzi vanno intesi valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 x 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $\frac{1}{2}$ pag. fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ pag. fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ pag. fr. 77.-; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Svizzera.

Casa editrice Birkhäuser, Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15
Tel. 249800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 36.-; other countries fr. 46.-. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 x 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $\frac{1}{2}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{8}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15
Phone 249800; Telegrams: Edita Basle

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG., Basel

Verzeichnis der Inserenten - Liste des annonceurs - List of Advertisers - Experientia XI/8

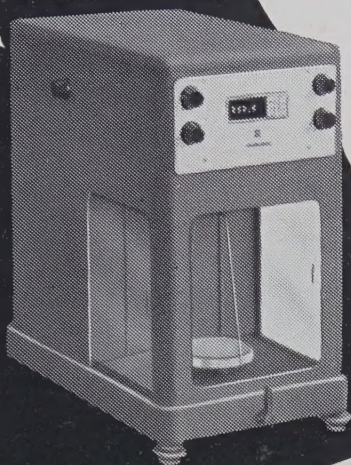
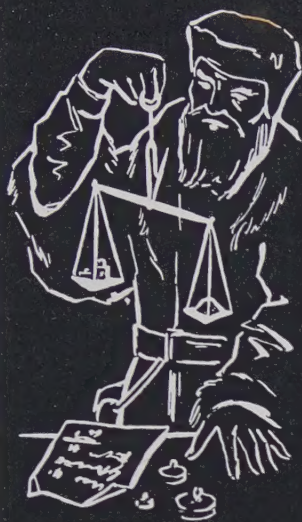
Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel

Ganz & Co., Zürich
Lonza AG., Basel

E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel

Benno Schwabe & Co., Basel
Verlag Chemie GmbH, Weinheim

mit der Zeit gehen



heisst die Devise des fortschrittlichen Chemikers. Er bevorzugt deshalb die nach den modernsten Grundsätzen konstruierte METTLER Analysenwaage. Das Prinzip der konstanten Belastung gewährleistet maximale Genauigkeit. Verlangen Sie bitte eine unverbindliche Demonstration.



Mettler
ANALYSENWAAGE

E. METTLER ZÜRICH 1 SCHWEIZ PELIKANSTR. 19

TEL. (051) 25 25 70

Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta

Seit 1943 offizielles Publikationsorgan des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen

Fasc. 1 (1955) enthält folgende Arbeiten:

C. RADOUCO-THOMAS, ED. FROMMEL et S. RADOUCO-THOMAS: *Médication antiépileptique et activité cholinestérasique* – K. BUCHER: *Der Luftgehalt der Lunge bei Pneumothorax* – A. PLETSCHER, P. VON PLANTA und W. A. HUNZINGER: *Beeinflussung der Fructose- und Glukosepermeabilität von Erythrocyten durch Temperatur, Cortison und Insulin* – A. PLETSCHER und H. RENSCHLER: *Intermediäre Brenztraubensäurebildung aus Fructose und Glukose bei Gesunden, Hepatitis und Alkoholwirkung* – L. DETTLI, F. GRÜN und K. BUCHER: *Probleme des Gasaustausches in der Lunge* – H. WIRZ: *Druckmessung in Kapillaren und Tubuli der Niere durch Mikropunktion* – M. STAEHELIN: *In-vitro-Effekte des Thyroxins auf isolierte Lebermitochondrien* – H. KUNZ und F. LEUTHARDT: *Über die enzymatische Synthese der Hippursäure am Benzoylpantethein und Glykokoll* – K. BUCHER, L. DETTLI, K. WEISSER und D. VON CAPELLER: *Über primär kardiale Regulationen bei der gegenseitigen Anpassung von Lungen- und Körperkreislauf* – H. JATZKEWITZ: *Bemerkung zur Publikation von P. N. Witt.*

Preis des Jahresabonnements:

Fr. 40.–, zuzüglich Porto. Vorzugspreis für wissenschaftliche Institute: Fr. 33.50, zuzüglich Porto.

Abonnementsbestellungen an die Buchhandlungen oder direkt an

BENNO SCHWABE & CO · VERLAG · BASEL

BECKMAN

**AUTOMATISCHES
QUARZ-SPEKTROPHOTOMETER**

MODELL

DK-2



- Ultraviolett bis Nah-Infrarot
200-3000 $m\mu$
- Wahlweise lineare Aufzeichnung in
Transmission und Extinktion
- Differentialmessungen an nahezu
gleichen Proben
- Auflösung: 0,3 $m\mu$ im UV
1 $m\mu$ im Sichtbaren
3 $m\mu$ im IR
- Doppelstrahlprinzip kombiniert mit den
Vorteilen des Einstahlverfahrens
- Empfänger: Pbs-Zellen modernster
Konstruktion. IP28 Photomultiplier
- Wechselstromnetzanschluss 220 V
50 Hz. Eingebaute hochwirksame
Stabilisation
- Flammenzusatz lieferbar, Reflexions-
Messzusatz in Vorbereitung

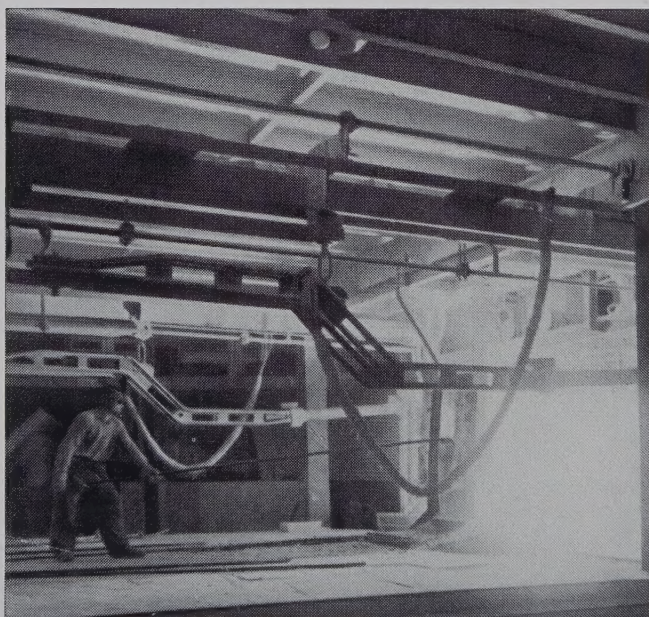
Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

Bitte verlangen Sie Prospekt Nr. 377/E

GANZ & Co.

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich



LONZA

ELEKTRIZITÄTWERKE UND CHEMISCHE FABRIKEN · AKTIENGESELLSCHAFT · BASEL

Calcium-Carbid für Beleuchtungs-, Heiz- und
Schweisszwecke

Metalllegierungen: Ferrosilicium, Reinsilicium,
Ferro-Silico-Aluminium, Ferro-Silico-Aluminium-
Mangan, Silicium-Calcium-Aluminium, Calcium-
silicium

Graphit

Künstliche Schleifmittel: Siliciumcarbid, Lonsicar
(Siliciumcarbid) für Hartbeton

Stickstoff-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter,
Ammonsulfat, Kalkstickstoff

Komplex-Dünger: Nitrophosphat, Nitrophosphat-
kali, Volldünger, Composto Lonza

Chemische Produkte: Formaldehyd, Acetaldehyd,
Crotonaldehyd, Paraldehyd, Essigsäure, Essig-
säureanhydrid, Natriumacetat, Dicyandiamid,
Guanidinnitrat, Ammoniak, Salpetersäure, Ni-
triersäure, Natriumnitrit, Natriumnitrat, Harn-
stoff, Ammonnitrat, Nitrobenzol, Anilinöl, Vinyl-
acetat monomer

Organische Lösungsmittel: Aceton, Aethylacetat,
Methyl- und Butylalkohol und deren Acetate,
Speziallösungsmittel

Cellulose-Acetat

Vinylharze: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Poly-
vinylalkohol, Mischpolymerisate

Effects of Ultra-Violet Light on Nucleic Acid and Nucleoproteins and Other Biological Systems¹

By J. A. V. BUTLER², London

It may be helpful to start with a rather general picture of the chemical and physico-chemical background of U.V. processes and also to discuss in a rather general way the possible links between the chemical phenomena and the biological effects observed. I think it will be clear that there is at present a very considerable gap between the chemistry and the biology, i.e. it is impossible to say precisely what the biological effects will be, even if we know what chemical actions were produced.

The action of light on simple chemical compounds is fairly well understood. The general result of the absorption of light by a system of nuclei and electrons is an electronic excitation, i.e. the displacement of one or more electrons from the levels they occupy in the unexcited molecule to excited states of higher energy. The energy so gained may be used in the following ways:

- (1) Re-radiation (fluorescence; phosphorescence).
- (2) Degradation to thermal vibrations of atoms.
- (3) In bringing about chemical changes in the excited molecule, e.g. a breakage of co-valent or other bonds resulting in dissociation of the excited molecule. This happens when the energy level of the excited state is above that of the dissociated molecule.
- (4) By collision with other atoms or molecules: the transfer of excitation energy to colliding molecules may occur and chemical reactions may as a consequence take place in these.

Many examples of such processes are known. In applying these concepts to biological systems two kinds of difficulties arise:

- (1) Many of the absorbing molecules, e.g. proteins, nucleic acids, are extremely complex and it is usually impossible to decide what is the activated state and to trace its history.
- (2) Of the many compounds which are capable of absorbing radiation, it is not known and can only be decided by indirect evidence, which are important and which are secondary in bringing about the biological effect.

Much of the biological work has been concerned specifically with mutation. It must not be forgotten that this is a highly specialised result of u.v. radiation, since of the many actions which occur, most are lethal if the dose is sufficient and very few result in mutation. In the study of mutations produced by light we are dealing with a *non-typical* process. The lethal and other effects of light are equally important as the genetical effects. They are probably due to action of light on the *enzyme systems*. This is a little explored field which would repay examination—as many enzymes have prosthetic groups which absorb in u.v. or visible. It is probable that many of the effects of u.v. are due to disorganisation of the metabolism in the cell by inactivating or modifying critical metabolic systems.

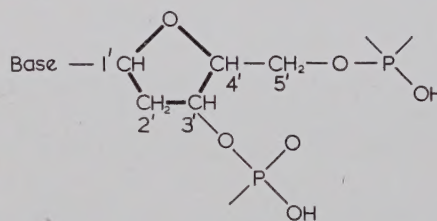


Fig. 1.—Structural formula of DNA.

It has been found that in many cases the action spectrum of light corresponds to the u.v. spectrum of nucleic acids. Since chromosomes contain DNA it is inferred that the light producing mutations is that absorbed by DNA. There are exceptions, however, e.g. the observation of MCAULEY and FORD that the maximum efficiency of irradiation of *Chaetomium* corresponds with absorption spectrum of proteins¹. There are also the observations of HOLLAENDER of two peaks in the action spectrum², one of which corresponds to absorption by proteins. I shall deal here principally with the action of u.v. on desoxyribonucleic acids. The formula of a typical part of the DNA chain is shown in Figure 1.

Direct action of u.v. on nucleic acids.—Although the absorption coefficients of nucleotides and of DNA are high, the quantum efficiency of chemical changes

¹ Lecture given to the Congrès International de Photobiologie, Amsterdam, August 1954.

² Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, London.

¹ T. M. MCAULEY and A. L. FORD, *Heredity* 1, 247 (1947).

² A. HOLLAENDER, K. B. RAPER, and R. D. COGHILL, *Amer. J. Botany* 32, 160 (1940).

produced is apparently low, but very few accurate measurements of chemical changes produced by u.v. light on these compounds have been made. ERRERA¹ gives values of the order of 10^{-2} – 10^{-5} in certain cases. It has been found that purines are very stable to u.v.; pyrimidines are less so, the pyrimidine ring being decomposed with the formation of urea², but it is doubtful if this occurs to any appreciable extent when the pyrimidine is present in DNA. There is a loss of viscosity of DNA (Fig. 2), but it is not certain that this is the result of the breakage of nucleotide chains³. It is difficult to be sure of this as only one break per particle will produce a considerable decrease of viscosity; however, no great change of molecular weight has been detected as a result of u.v. radiation. It is difficult to be sure, as the molecular weight methods can not be

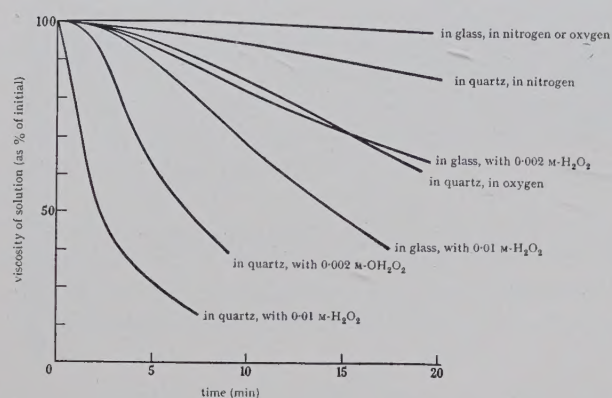


Fig. 2.—Change of viscosity of thymonucleic acid (0.1%) solutions with time when irradiated under various conditions, by means of mercury u.v. arc. at constant intensity [J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *Proc. Roy. Soc. [B]* 141, 562 (1953)].

applied easily to mixtures. It must be admitted that this conclusion may have to be reconsidered when more precise methods of measurement are available. However, it is more likely that the loss of viscosity is due to a partial collapse of the stiff DNA particle due to breakage of the hydrogen bonds which maintain the original configuration. The amount of energy absorbed is considerable. Much of the energy absorbed may be degraded to vibrational energy and lost as heat. One quantum of wavelength $2500 \text{ \AA} = 4.96 \text{ e.v.} = 115 \text{ kcal/mol}$, is sufficient to break at least 20 hydrogen bonds.

In case of proteins there is fairly clear evidence that u.v. radiation is capable of producing denaturation by breakage of H bonds e.g. CLARK⁴ (1937–1945) found

¹ M. ERRERA, *Biochem. Biophys. Acta* 8, 30, 115 (1952); *Progress in Biophysics* 3, 88 (1952).

² M. M. STIMSON and T. R. LOOFBOUROW, *J. Chem. Soc.* 8, 44 (1940).

³ J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *Proc. Roy. Soc. [B]* 141, 562 (1953).

⁴ J. B. CLARK, *Amer. J. Physiol.* 113, 538 (1935); *J. Gen. Physiol.* 19, 199 (1935); 27, 101 (1943). — E. V. RAJEWSKI, *Biochem. Z.* 227, 272 (1930).

that exposure to u.v. light lowers the flocculation temperature of serum albumen.

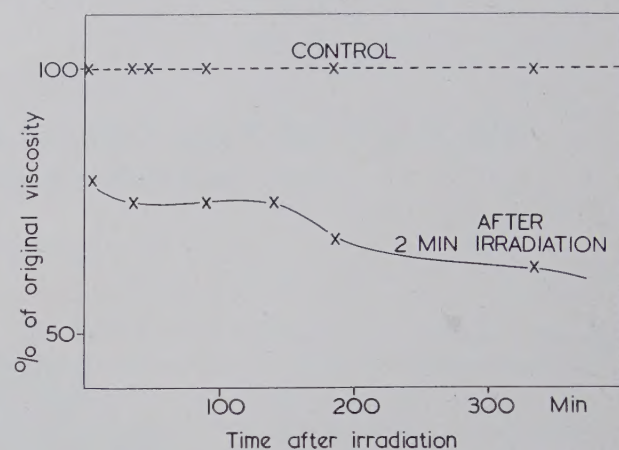


Fig. 3.—Change of viscosity of 0.05% DNA solution when kept at 40°C after 2 min u.v. irradiation in quartz tube in nitrogen.

We have found some indication that after u.v. irradiation, DNA is also more sensitive to heat degradation than originally (Fig. 3). This indicates that u.v. brings about changes which predispose the particle to heat denaturation and it is therefore probable that some hydrogen bonds are broken during the irradiation.

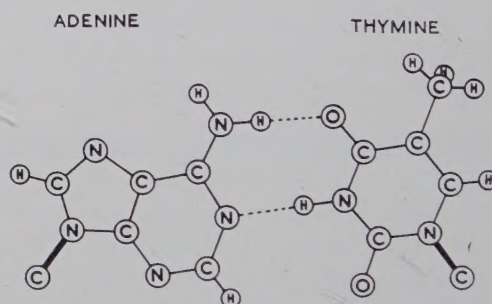


Fig. 4.—Hydrogen bonding of bases of DNA. [F. H. C. CRICK and J. D. WATSON, *Nature* 171, 737 (1953).]

In the case of DNA it is possible to give a more precise interpretation of the hydrogen bond breakage in terms of the WATSON and CRICK model¹, according to which two nucleotide threads are hydrogen-bonded together (Fig. 4). It is however, not at all clear, as we shall see later, why breakage of such hydrogen bonds should produce any genetical effects as they could easily be remade, and can only be remade in one way. However, it would be very difficult to assert that u.v. does not also cause minute amounts of deamination or dehydroxylation which would have a permanent effect. I shall discuss the biological effects of such changes later.

Indirect actions of u.v. and visible light.— We turn now to cases in which light is absorbed by other molecules in the presence of nucleic acids.

¹ J. D. WATSON and F. H. C. CRICK, *Nature* 171, 737 (1953).

(1) The dissociation of oxygen itself can be brought about by wavelengths $< 2530 \text{ \AA}$. The oxygen atoms formed are, of course, powerful oxidizing agents easily producing OH radicals, which can react directly with nucleic acid. The can also give rise to hydrogen peroxide in the solution, which will have effects discussed below. It is also possible that O_2 will be activated at rather lower wavelengths by light absorbed by the nucleic acid, although this has not been proved. DNA is certainly more rapidly degraded by u.v. light ($2500 \text{ \AA}$) in the presence than in the absence of oxygen (see Fig. 1).

(2) Hydrogen peroxide when present is dissociated with practically unit efficiency by light of wavelength $< 3100 \text{ \AA}$, and the main products is hydroxyl radicals: $H_2O_2 \rightarrow 2OH$. There are certain secondary reactions possible e.g.



but these are probably unimportant in the presence of an oxidizable substrate. The action of OH radicals on DNA is quantitatively very similar to that of X-rays. The loss of viscosity is of the same order as that produced by a quantity of X-rays which yield an equal number of OH radicals. Among the actions of photochemically formed hydroxyl radicals, which have been observed¹ or inferred are:

- (1) deamination of the bases,
- (2) dehydroxylation of the bases,
- (3) partial destruction of pyrimidine ring,
- (4) breakage of bond between the base and the sugar,
- (5) oxidation of alkyl groups (in the case of ethyl phosphates),
- (6) the breakage of the nucleotide chain and the liberation of phosphate.

It might be noted that the latter seems to be a consequence of the oxidation of the sugar moiety. This has not been proved directly, but in the case of the ethyl phosphates it is found² that an equivalent oxidation of the ethyl group always accompanies the liberation of the free phosphate. It is also found that with DNA the phosphate liberated increases approximately as the square of the time (Fig. 5)—which is due to the fact that in order to liberate a phosphate group, *two* adjacent sugar-phosphate links have to be broken. This explains why the yield of free PO_4 from small doses of OH radicals is very small, although the efficiency of the liberation of free phosphate from alkyl phosphates and simple nucleotides by the action of OH radicals is remarkably high, about one phosphate being liberated with adenosine for each H_2O_2 decomposed. It may be that a short chain reaction is occurring. But at least

we can infer from this that the hydroxyl radicals produced by irradiation of hydrogen and other peroxides are very efficient in breaking the nucleotide chain, as well as bringing about other degradative reactions. This is in strong contrast to the effect of u.v. alone.

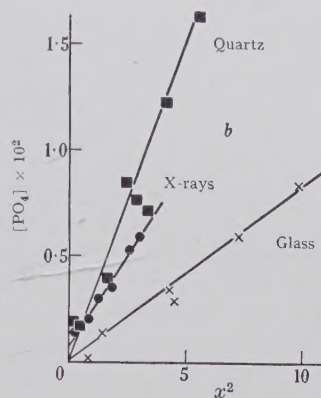


Fig. 5.—Amount of free phosphate liberated by irradiation under different conditions from thymonucleic acid, plotted against square of time. The unit of time is that which corresponds to the decomposition of 0.167% of 0.01 M-hydrogen peroxide; or in the case of the X-irradiation to $10^4 R$. The X-ray data are from J. WEISS and M. E. SCHOLES, *Exp. Cell. Res. Suppl.* 2, 219 (1952). [J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *Proc. Roy. Soc. [B]* 141, 562 (1953).]

(3) *After-effects of irradiation of DNA.*—I might refer here to the after-effects of irradiating DNA. As mentioned above, u.v. irradiation causes some after-effect on the viscosity in the absence of oxygen. It is much more marked in presence of oxygen. In the presence of hydrogen peroxide the loss of viscosity initiated by u.v. light continues in the dark until it is practically complete (Fig. 6). It is difficult to distinguish a genuine “after-effect” from the slow-continued action of hydrogen peroxide, because although the peroxide does not act on purified DNA, it is activated by and can then degrade DNA which has been damaged by X-rays¹ and the same might possibly be true of u.v. It is also possible that DNA which has been irradiated

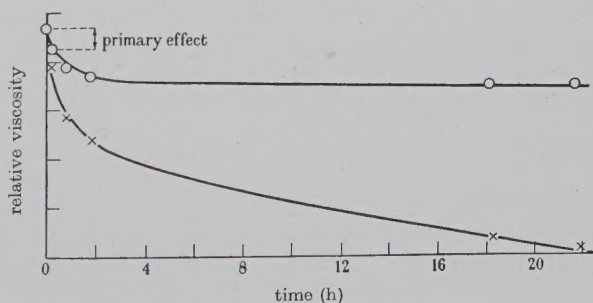


Fig. 6.—“After-effects” of irradiation of thymonucleic acid with hydrogen peroxide in quartz tube. —O— Effect of hydrogen peroxide ($5 \times 10^{-3} M$). —X— Effect of ultra-violet (0.5 min) in same solution. [J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *Proc. Roy. Soc. [B]* 141, 562 (1953).]

¹ J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *Proc. Roy. Soc. [B]* 141, 562 (1953). — B. E. CONWAY and J. A. V. BUTLER, *J. Chem. Soc.* 1952, 834.

² J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, *Proc. Roy. Soc.* 141, 562 (1953).

¹ This may not take place in the course of the enzymic decomposition of H_2O_2 by catalase. It is possibly due to imparities in the catalase.

by u.v. can initiate a radical decomposition of H_2O_2 which continues in the dark. However, the question of whether H_2O_2 can act on DNA in the dark is largely an academic one, as tissues contain substances, e.g. ascorbic acid and cysteine, which are capable of activating H_2O_2 ¹.

In view of the fact that catalase is sometimes added to remove H_2O_2 in experiments with viruses it might also be noted that the addition of catalase to remove hydrogen peroxide does not diminish the amount of phosphate liberated e.g. a solution of adenosine 5-phosphate, which, after illumination in the presence of H_2O_2 contained 3.9 γ per ml of free phosphate, on standing for 24 h with catalase (which reduced the concentrations of H_2O_2 to zero), had 5.4 γ ; but without catalase, 4.9 γ of free phosphate. This is probably due to the formation of small amounts of radicals in the reaction between H_2O_2 and catalase². Even without any illumination, catalase- H_2O_2 releases a significant amount of phosphate from adenosine-5-phosphate.

I must also mention the possibility, discussed by WEISS and SCHOLES³, that phosphate is "labilized" by OH radicals owing to the oxidation of the O_4 carbon of the ribose, the keto-phosphate so formed being unstable and slowly hydrolysed by water. That such an effect probably occurs to some extent is shown by the following experiment with adenosine (ribose) 5-phosphate. 1 h treatment at 70° with 0.5 N H_2SO_4 hydrolyses very little phosphate from the unirradiated adenosine 5-phosphate (Table) but an appreciably greater amount after treatment with H_2O_2 + u.v.

It can be seen that the amount of "labile" phosphate formed is of the same magnitude as that liberated during the irradiation⁴.

Table—Liberation of phosphate from adenosine 5-phosphate

	Free PO_4 (initial) γ per ml	Free PO_4 (After 1 h hydrolysis with 0.5 N H_2SO_4) γ per m
1. Adenosine 5-phosphate . . .	0.26	0.34
2. Same after 1 h u.v. + H_2O_2 .	3.3	6.8
3. Same after standing 24 h . . .	4.4	6.5

(4) *Formation of peroxides by u.v.-light.* There is also the related subject of peroxides produced by the action of u.v. on broth, etc., by which, as WYSS and STONE

have shown¹, mutations are produced, as easily as by direct exposure to u.v. These peroxides can be formed:

- by the action of H_2O_2 , formed as described above, on organic compounds,
- by the direct action of oxygen atoms on organic compounds,
- by the reaction of the activated compound on molecular oxygen, e.g. $R \rightarrow R^*$; $R^* + O_2 \rightarrow RO_2$.

Such peroxidic substances will behave similarly to hydrogen peroxide; they can produce OH radicals by spontaneous decomposition and by reacting with activating substances such as cysteine; radicals are also produced to some extent, probably, in the action of peroxidases. Peroxides like butyl hydroperoxide in presence of Fe^{++} easily cause radical degradation of DNA².

(5) *Action of other absorbing molecules, e.g. dyes.* This is a very large subject which has been very little explored. Dyes like methylene blue, when activated by light, can dehydrogenate the prosthetic groups of enzymes, and as result cause marked interference with metabolic processes. More deep seated changes may also be brought about e.g. in the presence of O_2 , H_2O_2 may be formed, which may react on genetic elements in the ways I have discussed above. The photodegradation of DNA by illumination in presence of dyes and carcinogen substances has been reported³. In general a large amount of illumination is required. In our own experiments it was found to be difficult to get consistent results owing to denaturation effects, but in some cases at least oxygen has acted as an inhibitor of degradation process, so that the primary action did not appear to be the activation of molecular oxygen.

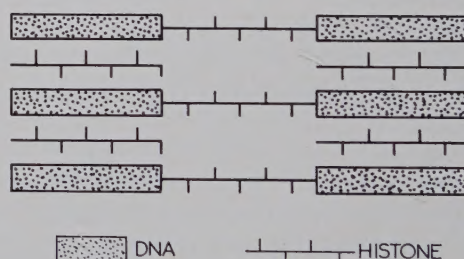


Fig. 7.—A possible structure of chromosomes: DNA particles joined by histone links.

Biological Consequences.—We can now ask, to what extent can these chemical actions, produced by u.v. and other radiations, be used to explain the biological effects e.g. chromosome breaks? The Watson and Crick model⁴ provided a possible explanation of how the duplication

¹ B. E. CONWAY, Brit. J. Radiol. 27, 42 (1954); Nature 173, 579 (1954).

² B. E. CONWAY and J. A. V. BUTLER, J. Chem. Soc. 1952, 834.

³ J. WEISS and M. E. SCHOLES, Exp. cell Research, suppl. 2, 219 (1952); Nature 171, 920 (1953).

⁴ For further experiments see J. WEISS and M. E. SCHOLES, Exp. cell Research, suppl. 2, 219 (1952); Nature 171, 920 (1953), and J. A. V. BUTLER and P. SIMSON, Liège, Symp. on Radiobiology, 1955, 46.

¹ W. S. STONE, O. WYSS, and F. HAAS, Proc. Nat. Acad. Sci. 33, 59 (1947).

² J. A. V. BUTLER and K. A. SMITH, Nature 165, 847 (1950).

³ G. OSTER and A. D. McLAREN, J. Gen. Physiol. 33, 215 (1950). — H. KOFFLER and I. L. MARKEDT, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76, 90 (1951).

⁴ J. D. WATSON and F. H. C. CRICK, Nature 171, 737, 964 (1953).

of a DNA fibre with its bases in a specific order can occur. One half of the double fibre is exactly complementary to the other half, so that each half can act as a template for the other. It is obvious that if one base is damaged by loss of $-NH_2$ or $-OH$, or more drastic ways, the reproduction of the fibre at this point could not occur and this would result in a break in the newly synthesized fibre. We have seen that hydrogen and other peroxides, both with and without u.v. illumination, can bring about such reactions and also cause complete breaks in the nucleotide chain.

There is little evidence that u.v., in the absence of oxygen or peroxides, can bring about such effects, at least on a detectable scale, although it may cause a kind of denaturation of the DNA as the result of breakage of hydrogen bonds. It is, as I pointed out, difficult to see how the mere breakage of hydrogen bonds between the two halves of the double fibre could produce permanent effects. However, what happens to nucleic acid cannot be the whole story, as there are also peptides and proteins which are formed by processes at present unknown. The DNA present in the cell as a complex with basic proteins—either protamines or histones, which may have equally important functions. It must also be remembered that the chromosome is a much larger entity than the nucleic acid particle and chromosome breaks are a phenomenon belonging to a much larger order of magnitude than the separate DNA particles. In the rat chromosome there are approximately 10^5 DNA particles. If we identify these particles with the genes, they must, according to the results of genetics, be combined in a linear order. How can this occur? It is possible, of course, that the DNA particles are united directly with each other; but they undoubtedly come apart quite easily in the presence of 2M salt, and are then found to be present in solution as distinct particles. If I am permitted to speculate a little, one possibility is that they are joined by histone links. We have found¹ that in beef thymus nucleoprotein there are at least two distinct histones, which are distinguishable electrophoretically and have different compositions. One contains a larger proportion of lysine in place of the usual arginine as the principal basic amino-acid. It is possible that one of these histones provides longitudinal links between the DNA particles while the other provides lateral links either within a single particle determine the way in which the fibre is folded; or between parallel fibres (see

Fig. 7)¹. The junctions of the nucleic acid with histone, being probably made by a "salt-like" bond, will probably represent weak points at which breakage more easily occurs.

It is thus possible for the excitation, produced by the u.v. light absorbed in the nucleotide thread, to be transmitted down the column of parallel nucleotide plates, until it produces strong vibrations at the end which are able to break the bond which unites the DNA to the histone. The continuity of the chromosome would thus be broken. However, as I said above, the biological properties may depend on a higher degree of complexity than that carried by a single nucleic acid fibre. The activity of the transforming principle is greatly reduced by quantities of u.v. which have no effect on the viscosity of DNA², u.v. therefore causes damage which is not immediately apparent in the viscosity, although as we have seen it may become so on heating.

I have discussed briefly the kinds of chemical effects which may be expected to occur when u.v. light acts on living cells, and particularly on the chromosomes. It will be evident that much remains to be done before the circumstances in which the photochemical reactions occur are clearly defined. Still less is known about the biological consequences of chemical changes and it is probable that the most urgent task at the present time is the study of ways of distinguishing and defining the different kinds of radiation damage.

I am indebted to Mr. F. S. FEATES and Mr. JOHNS for assistance in the experiments quoted.

Résumé

L'auteur a examiné les conséquences chimiques de l'absorption de radiations ultra-violettes par les substances présentes dans les cellules vivantes (en particulier l'acide désoxyribonucléique).

Les effets observés sont dus: 1° à l'absorption directe des radiations; 2° à une action directe — ou activée photodynamiquement — sur l'oxygène présent. Les conséquences de cette dernière sont très semblables à celles produites par les rayons X.

En ce qui concerne l'absorption directe des radiations U.V., il se pourrait que la rupture des chromosomes soit due à celle des liens existant entre les chaînes de DNA et l'histone.

¹ It has since been found that different DNA fractions are associated with the different histones [J. LUCY and J. A. V. BUTLER, *Biochim. Biophys. Acta* 16, 431 (1955)]. The general picture of DNA-histone interactions given here remains possible.

² S. ZAMENHOF, H. E. ALEXANDER, and G. LEIDY, *J. Exp. Med.* 98, 373 (1953).

¹ P. F. DAVISON, D. W. F. JAMES, K. V. SHOOTER, and J. A. V. BUTLER, *Biochim. Biophys. Acta* 1954.

Die physikalische Kieme der Wasserinsekten

Von H. P. WOLVEKAMP¹, Leiden

I. Einführung

Es gibt eine beträchtliche Anzahl von Wasserinsekten, die beim Untertauchen einen Luftvorrat mit sich führen. Diese Luft wird in einigen Fällen beinahe vollkommen in dem Hohlraum zwischen Rückenseite und Elythren aufbewahrt (Imago von *Dytiscus*); in anderen Fällen aber zum grössten Teil an der Aussenseite eines Teiles des Tierkörpers mitgeführt, einem Teil, der hydrophobe Eigenschaften hat, wobei die Luft also direktem Kontakt mit dem Wasser ausgesetzt ist.

Dass diesen Luftvorräten eine Bedeutung als Sauerstoffreservoir zukommt, hat man schon lange vermutet. Jedoch wurde diese Auffassung von einigen Zoologen, die behaupteten, dass dem Luftvorrat nur eine hydrostatische Funktion beigelegt werden dürfe, bestritten (BROCHER, 1912).

Es ist unbedingt richtig, dass die Luftvorräte eine hydrostatische Funktion haben. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür findet sich bei THORPE², der ausführlich beschrieben hat, wie der Käfer *Elmis* mit Hilfe seines Luftvorrates, der im Subelythralraum zusammengepresst werden kann, imstande ist, sein spezifisches Gewicht abzuändern, und so aktiv zur Wasseroberfläche aufsteigen oder zum Boden zurückkehren kann.

Von EGE³ wurde zuerst nachgewiesen, dass dem Luftvorrat aber auch eine respiratorische Bedeutung zukommt, indem er mit Hilfe des Mikro-Luftanalysenapparates von KROGH⁴ die quantitative Zusammensetzung der Luftblase einiger Wasserinsekten (*Dytiscidae*, *Notonecta* und *Corixa*) nach verschiedenen Tauchzeiten bestimmte. Er wies nach, dass der prozentuale Sauerstoffgehalt sich innerhalb sehr kurzer Zeit verringert, was, da das Wasser mit atmosphärischer Luft gesättigt war, nur durch Sauerstoffverbrauch durch das Tier erklärt werden kann.

STRAUSS-DURCKHEIM hat aber schon 1828 darauf hingewiesen, dass in Fällen, in denen der Luftvorrat dem Wasser exponiert ist, diese Verringerung des Sauerstoffgehalts von einer Aufnahme von Sauerstoff aus dem Wasser in die Gasblase gefolgt werden müsse. Dieser Auffassung haben sich u.a. DUTROCHET (1833) und später COMSTOCK (1887) angeschlossen. Doch so

unabweislich diese Folgerung auch war, solange quantitative Versuchsergebnisse fehlten, war über die praktische Bedeutung dieses Respirationsmechanismus kaum etwas auszusagen.

Nach 1900 haben sich dann einige Untersucher näher mit diesem Atmungstypus befasst. JORDAN prägte (1927) für die als Atmungsorgan fungierende Gasblase den Namen «physikalische Kieme».

EGE¹ begründete die Theorie der Funktion der physikalischen Kieme sowohl durch theoretische Deduktionen als durch Beobachtungen und Experimente, die er im Kroghschen Institut ausführte. Die von ihm und von KROGH² entwickelte Vorstellung besagt kurzgefasst das Folgende. Die totale Gasspannung in der Gasblase beträgt infolge des Wasserdruckes etwas mehr als eine Atmosphäre. Die Sauerstoffaufnahme durch Atmung verursacht eine mehr oder weniger beträchtliche Senkung des Sauerstoffpartialdruckes. Infolgedessen diffundiert Sauerstoff aus dem Wasser in die physikalische Kieme hinein, falls das Wasser mit Luft von einer Atmosphäre Druck gesättigt ist. Die vom Tier abgegebene Kohlensäure diffundiert sehr schnell aus der Gasblase hinaus infolge der sehr grossen Löslichkeit dieses Gases. Ein Ersatz des verschwundenen Sauerstoffs durch CO₂ findet deshalb nicht statt. Bei konstantem Totaldruck des Gases wird also eine Erhöhung des Stickstoffdruckes auftreten, die ungefähr denselben Zahlenwert hat wie die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes. Der hydrostatische Druck, der Sauerstoffverbrauch und der erhöhte Stickstoffpartialdruck verursachen ein allmähliches Verschwinden der Gasblase. Für die Funktion der physikalischen Kieme ist die Grösse der mit dem Wasser in Kontakt stehenden Oberfläche des Gasvorrates von ausschlaggebender Bedeutung. (Ich möchte darauf hinweisen, dass diese Oberfläche sich in vielen Fällen während der Verkleinerung des Gasvolumens kaum ändert, da die Luftmenge bestimmte Teile des Körpers in einer relativ dünnen Schicht bedeckt, die Krümmung der freien Oberfläche also ziemlich gering ist.)

Der Stickstoff spielt eine sehr wichtige Rolle als Empfangsphase; denn in einer Sauerstoffblase findet selbstverständlich durch Sauerstoffschwund keine Verringerung des Sauerstoffdruckes statt, und es wird deshalb keine O₂-Aufnahme stattfinden, selbst nicht aus mit Sauerstoff gesättigtem Wasser. Wichtig ist

¹ Institut für experimentelle Zoologie der Reichsuniversität, Leiden, Niederlande.

² W. H. THORPE, Biol. Rev. 25, 344 (1950).

³ R. EGE, Z. allg. Physiol. 17, 81 (1915).

⁴ A. KROGH, *The Comparative Physiology of Respiratory Mechanisms* (Pennsylvania Press, Philadelphia 1941), 172 S.

¹ R. EGE, Z. allg. Physiol. 17, 81 (1915).

² A. KROGH, *The Comparative Physiology of Respiratory Mechanisms* (Pennsylvania Press Philadelphia, 1941), 172 S.

noch, dass die Diffusion des Sauerstoffs dreimal so schnell verläuft als diejenige des Stickstoffes. Infolgedessen wird, wie EGE¹ auch experimentell nachwies, eine vom Wasserinsekt mitgenommene Sauerstoffblase in mit O₂ gesättigtem Wasser viel schneller verschwinden als eine Luftblase in mit Luft saturiertem Wasser. Die obenerwähnte Theorie erklärt das merkwürdige Resultat des folgenden EGESchen Versuches. Ein Rückenschwimmer (*Notonecta glauca* L.), der mit einem Sauerstoffvorrat untergetaucht war in mit O₂ gesättigtem Wasser, hatte in 14 Minuten seinen Gasvorrat verbraucht und war nach 35 min tot, während ein anderes Tier mit einer Luftblase in Wasser, das mit der Atmosphäre im Diffusionsgleichgewicht war, sechs Stunden am Leben blieb.

EGE¹ hat durch Berechnungen, basiert auf den Werten des Sauerstoffpartialdruckes in der Gasphase nach verschiedenen Tauchzeiten, nachzuweisen versucht, dass die physikalische Kieme die Beschaffung ausreichender Sauerstoffmengen besorgen kann. Er benutzte dafür die Formel

$$p_1 - p_2 = \frac{M \cdot 760}{\gamma \cdot s},$$

wo $p_1 - p_2$ die Differenz der Sauerstofftensionen im Wasser und in der Gasblase, M das Volumen des Gases, das die Gasphase pro Minute verlässt, s die freie Oberfläche des Gasvorrats und γ den sogenannten Invasionskoeffizienten darstellen. Der Gasschwund wurde mit dem Sauerstoffverbrauch des Tieres, der im Kroghschen Respirometer – also in der Luft! – bestimmt wurde, gleichgesetzt. Der Invasionskoeffizient wurde eigens für diese Berechnungen neu bestimmt.

Gegen dieses Vorgehen sind zwei Einwände zu machen. Die Atmungsgrösse in der Luft braucht nicht derjenigen beim Wasserleben gleich zu sein. Wichtiger ist die Tatsache, dass es sich bei der «Invasion» um eine Diffusion durch eine ruhende Wasserschicht handelt, die an die Gasphase grenzt. Über die Dicke dieser Schicht beim ruhenden oder beim umherschwimmenden Tier lässt sich aber kaum etwas aussagen. Das heisst also, der Invasionskoeffizient darf nicht als eine Konstante betrachtet werden, und damit werden die Resultate der Berechnungen hinfällig. Der Bedeutung eventueller Ventilationsbewegungen hat EGE¹ keine besondere Aufmerksamkeit zugewendet.

Aus weiteren Beobachtungen ging hervor, dass der Rückenschwimmer in mit atmosphärischer Luft gesättigtem Wasser erst nach 6 h starb, in mit Stickstoff saturiertem Wasser aber schon nach 5 min leblos war. Diese Wahrnehmung beweist, dass das Tier imstande ist, dem Wasser Sauerstoff zu entziehen. Dass hierbei die Kiemenfunktion des Gasvorrats von ausschlaggebender Bedeutung ist, beweist eine andere Beobachtung. *Notonecta* hat seinen Luftvorrat unter den

Elythren und an der Bauchseite, wo er von zwei Reihen von hydrophoben Haaren bedeckt wird. Daneben haftet nach dem Untertauchen eine sehr dünne Luftschicht an der Oberseite der Elythren. Diese Schicht lässt sich durch Abreiben entfernen, wobei die Oberfläche der Flügeldecken ihre hydrofuge Eigenschaft verliert. Wenn das Tier nun gezwungen wird, ohne diese Luftschicht unterzutauchen, ist es schon nach 15 min tot. Eine Schädigung des Tieres selbst findet, wie wir bei Nachprüfung dieses Versuches mehrmals feststellen konnten, nicht statt: kann das Tier regelmässig an die Oberfläche kommen, um seinen Luftvorrat zu erneuern, dann bleibt es am Leben. Für *Notonecta* steht die Kiemenfunktion dieser Luftschicht also fest.

Im übrigen aber stimmt die Behauptung von POPHAM¹, dass die Bedeutung der Kiemenfunktion weder von EGE noch von uns (DE RUITER *et al.*²) streng bewiesen wurde. Es wäre immerhin noch möglich, dass der Sauerstoff regelrecht aus dem Wasser durch die Haut aufgenommen würde. In der Tat haben WOLVEKAMP und VLASBLOM³ gefunden, dass beim Wasserskorpion (*Nepa cinerea* L.) ein Teil des Sauerstoffes auch ohne Gaskieme und zwar durch die dorsale Seite des Abdomens aufgenommen werden kann (zitiert in DE RUITER *et al.*²).

POPHAM¹ selbst wies die Kiemenfunktion des Gasvorrates von *Corixa Geoffroyi* nach, indem er einige Tiere in einem verstöpselten Erlenmeyerkolben hielt, der mit stickstoffgesättigtem Wasser gefüllt war; andere Tiere wiederum hielt er in einer Flasche, in welcher sich mit Luft saturiertes Wasser befand. In beiden Fällen waren die Behälter nicht völlig mit Wasser gefüllt, und es wurde kontinuierlich ein Stickstoffstrom durch die Gasräume der Flaschen hindurchgeleitet. Im ersten Falle tauchten die Tiere nur einige Male unter und blieben danach hilflos an der Oberfläche des Wassers treiben, wo sie bald starben. Im zweiten Falle aber blieben die Tiere, die gelegentlich ihren Gasvorrat erneuerten, am Leben, offenbar weil sie dem Wasser genügend Sauerstoff entziehen konnten. Dass dafür die Gasblase notwendig war, zeigte sich in einem dritten Versuch, wo der Gasvorrat entfernt und die Stigmata mittels Vaseline verschlossen wurden. Die Tiere starben schnell, konnten offenbar ihren Bedarf an Sauerstoff nicht in ausreichender Weise durch Hautatmung decken.

Schliesslich hat VLASBLOM⁴ vor kurzem die Kiemenfunktion des Gasvorrats einiger Wasserinsekten nachgewiesen, indem er die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser in verstöpselten Flaschen von Wanzen mit

¹ R. EGE, Z. allg. Physiol. 17, 81 (1915).

¹ E. J. POPHAM, Proc. Roy. Entom. Soc. 29, 51 (1954).

² L. DE RUITER, H. P. WOLVEKAMP, A. J. VAN TOOREN und A. G. VLASBLOM, Acta Physiol. Pharm. Neerl. 2, 180 (1952).

³ H. P. WOLVEKAMP und A. G. VLASBLOM, Acta Physiol. Pharm. Neerl. 2, 214 (1952).

⁴ A. VLASBLOM, unveröffentlichte Versuche.

Luftvorrat verglich mit derjenigen von Tieren ohne Luftvorrat. Es zeigte sich, dass *Notonecta* nach Entfernung der Luftschicht auf den Flügeldecken praktisch keinen Sauerstoff aufnimmt. Bei *Corixa* und *Naucoris* sinkt der Sauerstoffverbrauch stark herab (Tab. I); bei der kleinen Wanze *Sigara* aber scheint die Hautatmung einen bedeutenden Wert erreichen zu können.

Tabelle I

Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser, ohne und mit physikalischer Kieme; Temperatur 20°. Gemessen in cm³/K.Tier/Stunde

	Ohne Kieme	Mit Kieme
<i>Notonecta</i> . . .	0 – 25,5	217,5–326
<i>Corixa</i> . . .	42 – 51,5	258,5–323
<i>Naucoris</i> . . .	17 – 33	210,5–282,5
<i>Sigara</i> . . .	212,5–315	371,5–470

II. Die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser als Kettenprozess

Die Teilprozesse, die die Grösse der Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser beherrschen, sind folgende:

1. *Der Sauerstoffverbrauch in den Geweben.* Dieser Verbrauch ist selbstverständlich von der Temperatur und von der Aktivität des Tieres abhängig und deshalb ausserordentlich starken Schwankungen unterworfen.

2. *Die Sauerstoffdiffusion im Tracheensystem.* In einigen Fällen lässt sich, wie KROGH¹ nachgewiesen hat, das Sauerstoffpartialdruckgefälle an Hand von Messungen der anatomischen Dimensionen und von Bestimmungen des Gasstoffwechsels berechnen. Häufig gibt es aber Komplikationen: die Stigmata sind oft periodenweise verschlossen; Teile des Tracheensystems werden bei vielen Insekten ventiliert, und die Tracheolen sind in wechselndem Ausmass mit Flüssigkeit gefüllt (WIGGLESWORTH). Jedenfalls besteht wohl immer ein beträchtlicher Unterschied zwischen den Werten des Sauerstoffpartialdruckes in den Tracheolen und denjenigen am Eingang der grossen Tracheenstämme.

3. *Die Sauerstoffdiffusion in dem Gasvorrat.* Wenn die Stigmata o.W. in die Luftblase ausmünden, wird das Gefälle des Sauerstoffdruckes zwischen der Gasblasenoberfläche und den Stigmata sehr klein sein, da hier die Diffusion nicht in einer engen Röhre (wie im Tracheensystem) stattfindet.

Allerdings gibt es Fälle, in denen der Zustand weniger einfach ist. So sind die Diffusionsverhältnisse bei *Notonecta* bestimmt weniger günstig, da die Luftschicht auf den Elythra sehr dünn ist und der Sauerstoff durch diesen engen Luftraum seitwärts abgeführt werden muss, um die an der Bauchseite gelegenen, in den grossen Luftvorrat ausmündenden Stigmata erreichen zu können. Eine mathematische Formulierung dieser Verhältnisse ist praktisch kaum ausführbar.

4. *Die Diffusion durch die Grenzschicht Wasser-Luft.* BOHR und später KROGH haben diesem Prozess eine

sehr spezielle Bedeutung beigelegt und sich viel Mühe gegeben, den sogenannten Invasionskoeffizienten, also die Grösse der pro Zeiteinheit unter Standardbedingungen durch die Grenzfläche hindurch diffundierenden Sauerstoffmenge zu messen. Es hat sich aber gezeigt, dass die erhaltenen Werte mit abnehmender Dicke des von ihnen benutzten Wasserfilms stark zunehmen. Das heisst also, die Diffusionsgeschwindigkeit in der Wasserschicht, die an die Gasphase grenzt, spielt bei diesen Bestimmungen eine überragende Rolle. Wahrscheinlich wird die Diffusion in der äussersten (ein oder zwei Molekülabstände) Wasserschicht gar nicht besonders verzögert. Da nun die Dicke der ruhenden Wasserschicht, wie wir sogleich sehen werden, bestimmt stark wechselt, können Berechnungen, wie EGE¹ sie ausführt – wobei die von ihm bestimmten Werte des Invasionskoeffizienten benutzt wurden –, nicht zu brauchbaren Ergebnissen führen.

5. *Die Diffusion in obengenannter Wasserschicht.* Hierbei ist anzunehmen, dass es einen allmählichen Übergang zwischen der vom Tiere mitgezogenen, also in bezug auf das Tier ruhenden Wasserschicht und dem am Tier vorüberströmenden Wasser gibt. In dieser Schicht muss die Herbeischaffung des Sauerstoffs wieder durch Diffusion stattfinden. Wenn die Wasserinsekten sich ruhig verhalten, werden die Diffusionsverhältnisse, besonders in stehendem Wasser, sehr ungünstig sein, wenn keine Ventilationsbewegungen ausgeführt werden.

Aus dem Vorhergehenden dürfen wir folgern, dass für ein richtiges Verständnis der Atmungsfunktion des Gasvorrats nicht nur die Oberfläche der physikalischen Kieme, sondern auch die Bedeutung der Ventilationsbewegungen untersucht werden muss. Auch ist es wohl unumgänglich notwendig, die Aufnahme von Sauerstoff aus dem Wasser direkt zu bestimmen; Berechnungen, wie EGE¹ sie ausführte, sind mit grossen Unsicherheiten behaftet.

III. Die Bedeutung der Ventilationsbewegungen (DE RUITER et al.²)

Von den Wasserkäfern *Dytiscus marginalis* L. (Gelbrand), *Hydrous piceus* L. (Kolbenwasserkäfer) und den Wanzen *Naucoris cimicoides* L. (gemeine Schwimmwanze) und *Notonecta glauca* L. (Rückenschwimmer) wurden bestimmt:

die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser,
das Volumen des Luftvorrates pro g/Tier,
die freie Oberfläche der Gasblase pro g/Tier
und im Falle von *Hydrous* auch der Gasstoffwechsel, wenn das Tier den Sauerstoff nicht nur dem Wasser, sondern auch der Luft entnehmen kann. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle II.

¹ R. EGE, Z. allg. Physiol. 17, 81 (1915).

² A. KROGH, *The Comparative Physiology of Respiratory Mechanisms* (Pennsylvania Press, Philadelphia 1941), 172 S.

² L. DE RUITER, H. P. WOLVEKAMP, A. J. VAN TOOREN und A. G. VLASBLOM, Acta Physiol. Pharm. Neerl. 2, 180 (1952).

Tabelle II

	Temperatur	O ₂ -Verbrauch bei Luft-Wasser-Atmung in cm ³ /K.Tier/Stunde	O ₂ -Verbrauch bei Wasseratmung in cm ³ /K.Tier/Stunde	Volumen der Gasblase in mm ³ pro Gramm Körpergewicht (mittlere Zahl mehrerer Bestimmungen)	Freie Oberfläche der Gasblase in cm ² pro Gramm Körpergewicht (mittlere Zahl mehrerer Bestimmungen)
<i>Dytiscus marginalis</i> . .	20°	42–102	17– 17,5	45,9	0,1
<i>Hydrous piceus</i> . . .	20°		18– 27		1,42
	15°				
<i>Naucoris cimicoides</i> . .	20°		127–164		2,05
<i>Notonecta glauca</i> . . .	20°		145–263		4,65

Die Versuchsergebnisse führen zu dem Schluss, dass offenbar eine relativ grosse, dem Wasser exponierte Oberfläche der Luftblase nicht genügt, um eine beträchtliche Aufnahme von Sauerstoff zu gewährleisten, denn wiewohl bei *Hydrous* diese Oberfläche viel grösser ist als bei *Dytiscus* – der Kolbenwasserkäfer steht in dieser Hinsicht der gemeinen Schwimmwanze wenig nach –, ist seine Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser kaum grösser als diejenige vom Gelbrand. Dass dies nicht herrührt von einem geringen Sauerstoffbedarf bei diesem sehr trägen Pflanzenfresser, geht aus der Bestimmung der Gesamtatmung (Spalte 1) genügend hervor.

Ebensowenig darf behauptet werden, dass *Hydrous* einen besonders grossen Luftvorrat beim Untertauchen mitnimmt, der erneuert werden würde, lange bevor der Sauerstoffpartialdruck in ihm so niedrig würde, dass die Invasion von Sauerstoff einen beträchtlichen Wert bekäme; denn das Volumen des Gasvorrats pro g/Tier ist bedeutend kleiner als bei den Wanzen. Offenbar ist, wenigstens bei höheren Temperaturen, für das Funktionieren der physikalischen Kieme das Auftreten eines Wasserstromes notwendig.

In erster Linie ist hervorzuheben, dass ein solcher Strom bei den lebhaften Wasserwanzen automatisch auftritt, wenn sie umherschwimmen, während dies bei dem langsam paddelnden *Hydrous* kaum der Fall sein wird.

In Ruhe klammern sich die Wanzen, in untergetauchtem Zustande, mit dem mittleren Beinpaar fest. Wenn die Ruhepause lange dauert, fängt das hintere Beinpaar an, in einem nicht ganz regelmässigen Rhythmus «Schwimmbewegungen» auszuführen. Diese Beinrhythmik tritt bei *Notonecta*, der im allgemeinen nur sehr kurze Ruhepausen hält, ausserdem oft an der Oberfläche verbleibt, im Freileben nur selten auf. Bei *Naucoris* kann man sie im Aquarium öfters wahrnehmen, während sie bei dem ruhigeren pflanzen- und detritusfressenden *Corixa* eine regelmässig auftretende Erscheinung ist.

Diese Beinbewegungen werden von HAGEMANN, KROGH, Frl. OORTWIJN-BOTJES u.a. als Ventilationsbewegungen im Dienste der Atmung gewertet. Diese

Behauptung haben wir beweisen können, indem wir die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser bestimmten,

- a) bei einem Tier, das an einer Unterlage angeheftet war, ohne die Bewegungsfreiheit der Schwimmbeine zu behindern,
- b) bei demselben Tier, wenn es frei umherschwimmt.

Es zeigte sich nun, dass die Sauerstoffaufnahme durch Immobilisieren des Tieres nicht oder kaum behindert wurde, solange die Beine sich frei bewegen können. Bei Fesselung der Beine sinkt der Sauerstoffverbrauch stark herab. Um die allerdings nicht sehr wahrscheinliche Möglichkeit auszuschliessen, dass es sich im letzteren Fall um eine Herabsetzung des Stoffwechsels durch ruhiges Verhalten handelt, wurde in anderen Versuchen die Sauerstoffaufnahme von vollständig immobilisierten Tieren gemessen, erstens wenn die Unterlage, worauf sie gefesselt waren, in Ruhe verharrte, zweitens während diese Unterlage rhythmisch auf und nieder bewegt wurde, wodurch eine künstliche Ventilation stattfand. Im letzteren Fall steigt der Sauerstoffverbrauch bedeutend an (Tab. III).

Tabelle III. Sauerstoffaufnahme mit und ohne Ventilation in cm³/K.Tier/Stunde (Tabelle aus Einzelversuchen kompiliert)

Tierart	Temperatur	Immobilisiert	Immobilisiert Beine gefesselt		Frei schwimmend
			Ruhe	Tier wird passiv rhythmisch bewegt	
<i>Naucoris</i>	± 20°	100–111	13–45	147–190	68–170
	± 5°	120–273	34–105		141–305
	– 20°		47–63		
<i>Notonecta</i>	± 21°	169–307	32–94	168–205	126–331
	± 21°		27–77		
<i>Hydrous</i>	18,5°		9–21,5	59,5–68,5	16– 33

Es ist zu bemerken, dass man durch diese künstliche Ventilation erreichen kann, dass *Hydrous*, der nie Ventilationsbewegungen ausführt und der sehr langsam schwimmt, dem Wasser bedeutend mehr Sauerstoff entnimmt als in freilebendem Zustand. Es muss noch nachdrücklich hervorgehoben werden, dass bei sehr niedrigen Temperaturen (± 5°), wie sie im Winter

vorherrschten, das stark herabgesunkene Sauerstoffbedürfnis mit Hilfe der physikalischen Kieme auch ohne Ventilationsbewegungen gedeckt werden kann.

IV. Die Atmungsregulation

Wir wollen hier nur zwei Regulierungsmechanismen, die im Dienste der Atmung stehen, erwähnen: erstens die Ventilation mit Hilfe der Schwimmbeine, zweitens die Erneuerung des Luftvorrats. Dass das Luftschöpfen auch auftritt in Beziehung zur zweiten, hydrostatischen Funktion der Luftblase, wenn nämlich das spezifische Gewicht des Tieres samt Luftvorrat zu niedrig geworden ist, soll hier nur beiläufig erwähnt werden (BROCHER, Frl. OORTWIJN-BOTJES).

Bei *Corixa Geoffroyi* LEACH wurde von Frl. OORTWIJN-BOTJES nachgewiesen, dass die Ventilationsbewegungen durch Kohlensäure angeregt werden, während Sauerstoffmangel das Tier zur Oberfläche treibt. In sauerstoffreichem Wasser treibt *Corixa* an der Oberfläche. Wir haben bei *Naucoris* und *Notonecta* ähnliche Ergebnisse erhalten, wobei noch hervorzuheben ist, dass der Rückenschwimmer gegen Sauerstoffmangel besonders empfindlich ist.

Die Versuche mit Kohlensäure wurden derart ausgeführt, dass die auf einer Unterlage fixierten Tiere in einem kleinen gläsernen Behälter beobachtet wurden. Das Gefäß wurde mit Wasser von bekanntem und wechselndem CO_2 -Gehalt gefüllt.

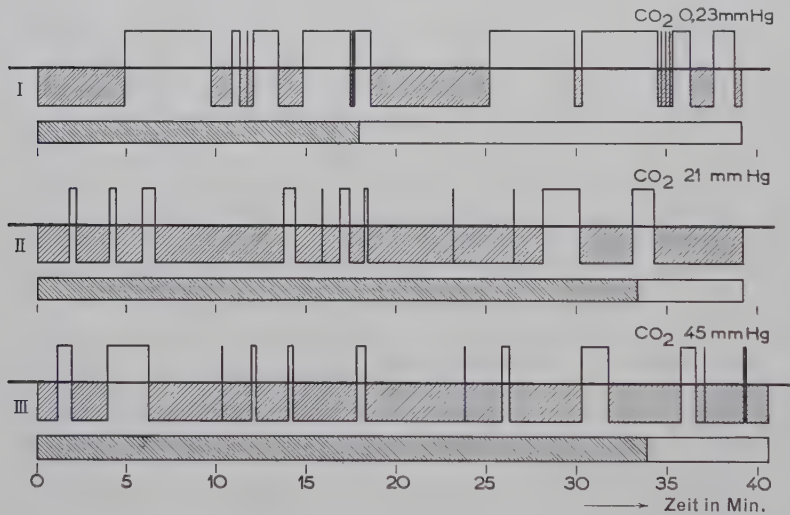


Abb. 1. Zeiten, die von *Notonecta* an der Oberfläche (weisse Areale über Bezugslinie) und in der Tiefe (schraffierte Areale) verbracht wurden. Unter jedem Diagramm ist obendrein die Totalsumme dieser Zeiten angegeben.

Die Absicht war, ähnlich wie in den klassischen Versuchen von HALDANE und PRIESTLEY, durch Anreicherung des Milieus mit Kohlensäure eine schnellere Erhöhung des Kohlensäuregehalts der Atmungsorgane zu erreichen, als es der Fall sein würde, wenn CO_2 nur von den Geweben geliefert wird. Keineswegs war es uns darum zu tun, Reaktionen auf den Kohlensäuregehalt des Milieus zu untersuchen, da in den natürlichen

Gewässern, in denen die Wasserwanzen leben, höhere CO_2 -Tensionen, wie KROGH¹ hervorgehoben hat, niemals vorkommen. In den Abbildungen 1 und 2 sind einige Versuche mit *Notonecta* graphisch wiedergegeben.

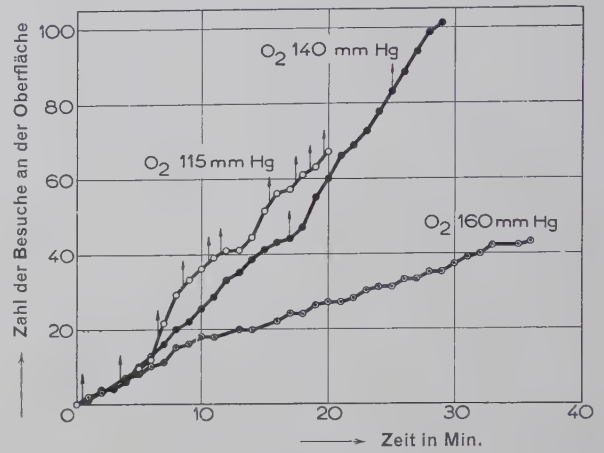


Abb. 2. *Notonecta*. Zahl der Besuche an die Oberfläche bei verschiedenen Sauerstofftensionen. Die Pfeile geben an, dass das Tier versucht, das Wasser zu verlassen.

V. Die Effizienz der physikalischen Kieme in Relation zur freien Oberfläche und zur Ventilation

Es ist deutlich, dass in vielen Fällen Ventilationsbewegungen für die Funktion einer physikalischen Kieme unumgänglich notwendig sind. Es wäre aber unrichtig, hieraus zu folgern, dass bei höheren Temperaturen, also bei intensivem Stoffwechsel, die Kiemenfunktion des Luftvorrates immer nur dann eine bedeutende Rolle spielt, wenn von der betreffenden Tierart ein Wasserstrom erzeugt wird. Die Wasserspinne (*Argyroneta aquatica* CLERCK) bewegt sich träge im Wasser umher. In bisher unveröffentlichten Versuchen von Frau E. JAEGER-DRAAFSEL² hat sich aber gezeigt, dass diese Spinne eine bedeutende «Wasseratmung» hat. Beiläufig sei noch bemerkt, dass dieses Tier auch ohne Luftkieme noch so viel Sauerstoff dem Wasser entziehen kann, dass es bei niedrigen Temperaturen im Winter nicht an der Oberfläche aufzutauchen braucht, um Luft zu schöpfen, wie aus Beobachtungen von WESENBERG-LUND³ und Versuchen in unserem Institut hervorgeht.

¹ A. KROGH, *The Comparative Physiology of Respiratory Mechanisms* (Pennsylvania Press, Philadelphia 1941), 172 S.

² E. JAEGER-DRAAFSEL, unveröffentlichte Versuche.

³ C. WESENBERG-LUND, *Biologie der Süßwasserinsekten* (Nordisk Forlag, J. Springer, Kopenhagen, Berlin, Wien 1943), 682 S.

VI. Die Bedeutung der physikalischen Kieme im Freileben

Wenn auch aus dem Vorhergehenden zur Genüge hervorgeht, dass den Luftvorräten der genannten Wasserinsekten eine Funktion als Atmungsorgan zukommt, so ist es doch nicht einfach, zu bestimmen, wie gross die Bedeutung dieser Kiemenfunktion im normalen Leben ist.

Im Winter kommen die Wanzen selten oder nie zur Oberfläche, und *Hydrous* schon gar nicht. Ob die Tiere zum Teil zu einem anoxybiotischen Stoffwechsel übergehen, ist nicht bekannt; jedenfalls verbrauchen sie auch bei den niederen Temperaturen im Winter Sauerstoff: *Hydrous* und *Notonecta* sterben in sauerstofffreiem Wasser sehr bald. *Naucoris* kann wenigstens einige Tage lang ohne Sauerstoff sein, wobei sie in einem komaähnlichen Zustand verharrt. Nach Verlust des Luftvorrates sterben die drei genannten Insekten nach kurzer oder langer Zeit. Es dauert übrigens sehr lange, bevor die Luftschicht verschwunden ist. Im Frühwinter sollen die Tiere ihren Luftvorrat aus den auch dann noch von den Wasserpflanzen gebildeten Sauerstoffblasen erneuern. Dies alles geht aus Beobachtungen von WESENBERG-LUND¹ hervor. In den soeben erwähnten Fällen steht die Lebenswichtigkeit der physikalischen Kieme wohl fest.

Um die Bedeutung der Wasseratmung im Sommer kennenzulernen, sollte man die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser mit der aus der Luft, unter Umständen, die denjenigen des Freilebens nahekommen, bestimmen können. Die methodischen und technischen Schwierigkeiten sind aber nicht unbedeutend. EGE² hat den Gesamtstoffwechsel einiger Wasserinsekten im Kroghschen Respirometer bestimmt. Es fragt sich aber, ob die so erhaltenen Zahlen übereinstimmen mit dem Sauerstoffverbrauch unter für diese Tiere normalen Umständen, das heisst beim Wasserleben.

Im Prinzip ist es natürlich möglich, in einem teils mit Wasser, teils mit Luft gefüllten Raum den Sauerstoffschwund bei Anwesenheit von Wasserinsekten in beiden Phasen zu bestimmen. Hierbei gibt es aber zwei Fehlerquellen, die zu berücksichtigen sind.

Erstens wird zwischen Wasser und Luft ein Gasaustausch stattfinden, sobald das Diffusionsgleichgewicht des Sauerstoffs zwischen den beiden Phasen durch die Atmung der Versuchstiere gestört ist. Indem man dem Respirationsgefäss die Gestalt eines Erlenmeyer-Kolbens gibt, wobei das Wasser bis in den engen Hals stehen soll, kann man diesen Fehler verringern, leider aber nicht aufheben. Abschliessung der Wasseroberfläche mit Paraffinöl ist bei der Untersuchung der Atmung der Wasserinsekten nicht möglich, da das Paraffinöl die hydrophoben Körperteile benetzt und in die Tracheen hineindringt.

Man kann aber jedenfalls in dieser Weise durch Addieren des in beiden Phasen verschwundenen Sauerstoffs den gesamten Sauerstoffverbrauch ermitteln. Indem dieser Wert verglichen wird mit demjenigen der Sauerstoffaufnahme in einer völlig mit Wasser gefüllten verstopften Flasche, bekommt man einen Eindruck von dem, was die physikalische Kieme eventuell leisten kann. Im normalen Leben wird es übrigens die Luftkieme wohl kaum zu diesen Maximalleistungen bringen.

Bei der technischen Ausführung derartiger Versuche liegt der Gedanke nahe, den Luftraum des Atmungsgefässes an ein Kroghsches Manometersystem anzuschliessen. Dabei würde man aber zu fehlerhaften Resultaten gelangen. Es wird von dem Luftvorrat nicht nur Sauerstoff an das Tier, sondern, nach erfolgter Senkung des Sauerstoffpartialdruckes, auch Stickstoff an das Wasser abgegeben. Es findet also ein Transport von Stickstoff von der Gasphase in das Wasser statt. Da aber der Sauerstoffschwund im Respirometer durch Messung der Verringerung des Totaldruckes oder des Volumens (bei konstantem Druck) der Gasphase nach erfolgter Absorption der vom Tiere abgegebenen Kohlensäure stattfindet, ist es ohne weiteres deutlich, dass der Stickstofftransport eine derartige Messung wertlos macht.

Wir haben deshalb einen Apparat konstruiert, der eine Kombination eines Respirometers mit einem Gasanalysenapparat nach HALDANE darstellt, während der Sauerstoffschwund im Wasser mit Hilfe der von VAN DAM ausgearbeiteten Mikromethode, die es erlaubt, den O₂-Gehalt in 1 cm³ Wasser zu bestimmen, ermittelt wird (WOLVEKAMP und VLASBLOM¹).

Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, dass der Apparat aus drei Teilen besteht: 1. dem Respirationsgefäss, das mit zwei Differentialmanometern verbunden ist, 2. einer mit Stickstoff gefüllten Haldaneschen Messbürette, 3. einer mit alkalischer Pyrogallollösung beschickten Sauerstoffabsorptionspipette.

In einem Blindversuch wird das Volumen des Respirationsluftraumes (zwischen den Hähnen 18 und 25) bestimmt, indem der Sauerstoff in der bei einer Gasanalyse gebräuchlichen Weise vom Pyrogallol absorbiert wird. Die Volumenverkleinerung, die auftritt, beträgt 20,95% des Totalvolumens. Nachdem der Stickstoff im Respirationsgefäss wieder durch Luft ersetzt ist, wird das Tier in das Seitenrohr 23 gebracht. Nach Verschliessen mit dem gläsernen Stöpsel 22, stellt man das Tier, in dem die Respirationskammer mit Hilfe eines Glasschliffs durch Drehung mit dem Seitenrohr in Verbindung gebracht ist, in die Gelegenheit, in den Atmungsraum überzugehen.

Am Ende des Versuches wird die Sauerstoffabnahme in der Gasphase und diejenige im Wasser bestimmt.

¹ C. WESENBERG-LUND, *Biologie der Süßwasserinsekten* (Nordisk Forlag, J. Springer, Kopenhagen, Berlin, Wien 1943), 682 S.

² R. EGE, *Z. allg. Physiol.* 17, 81 (1915).

¹ H. P. WOLVEKAMP und A. G. VLASBLOM, *Acta Physiol. Pharm. Neerl.* 2, 214 (1952).

Für technische Einzelheiten verweise ich auf die Originalarbeit.

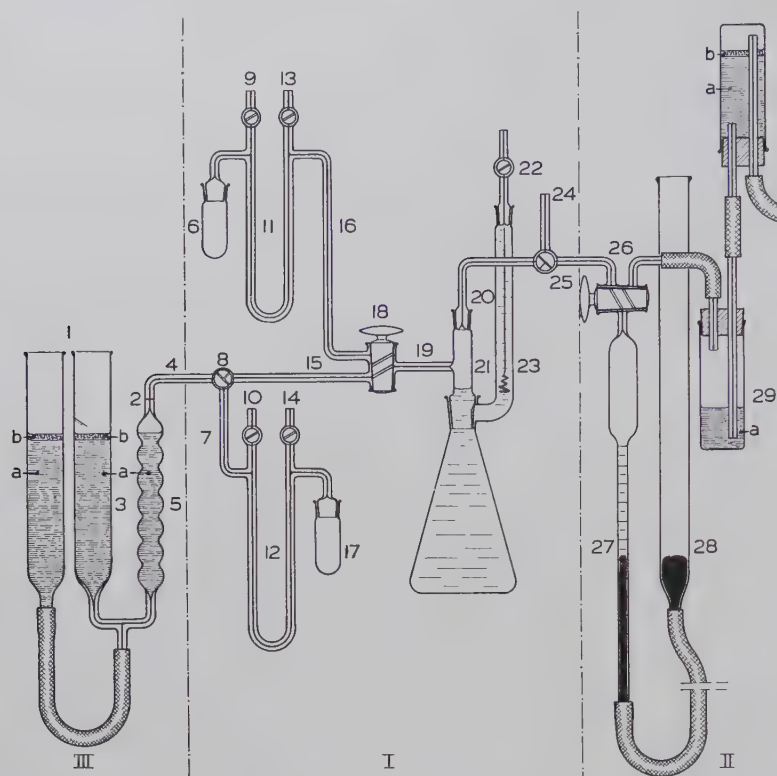


Abb. 3. Respirometer für Luft-Wasser-Atmung.

In Tabelle IV sind einige Ergebnisse von VLASBLOM zusammengefasst.

Tabelle IV
Resultate von Versuchen über die Bedeutung der Wasseratmung

Tierart	Datum	Temperatur	Sauerstoffaufnahme bei Wasseratmung in Prozenten des Totalverbrauches bei Wasser/Luft-Atmung
<i>Naucoris</i>	Dezember	10°	96 (52 -142)
	April	11°	59 (37 -114)
	Mai	15°	54 (21 -136)
	Juni	20°	30,5
	August	20°	28 (21 - 34,5)
<i>Notonecta</i>	Dezember	5°	85 (85 - 85,5)
	April-Mai	10°	63 (34,8- 91)
	August	20°	51 (35 - 70,5)
<i>Corixa</i>	November	5°	70,5 (56 - 80)
	Dezember	10°	64 (43 - 82)
	September	15°	55 (41 - 67)
	September	20°	61 (24 - 79)

VII. Einige Spezialfälle

1. Der Wasserskorpion (*Nepa cinerea* L.) entnimmt in erwachsenem Zustand der Atmosphäre Luft mit Hilfe eines Atmungsrohres. Die Luft wird unter den Flügeldecken aufbewahrt. Ventilationsbewegungen wurden u.a. von JORDAN beschrieben. Sie bestehen aus in unregelmässigem Rhythmus ausgeführten Hebun-

gen der Elythra, wobei eine «Wasserzunge» in die Luftmenge hineindringt (Abb. 4). VLASBLOM hat nachweisen können, dass in dieser Weise bedeutende Sauerstoffmengen aus dem Wasser aufgenommen werden. Wenn man die Ventilationsbewegungen ausschaltet, indem eine Drahtschlinge um den ganzen Hinterkörper herumgelegt und angezogen wird, sinkt die Sauerstoffaufnahme beträchtlich herab. Mit Hilfe der physikalischen Kieme kann das Tier bei Temperaturen unterhalb 10° seinen Sauerstoffbedarf decken.

Nepa hat auch eine nicht unbedeutende direkte Hautatmung, wobei besonders die Rückenseite des Abdomens eine wichtige Rolle spielt. Im Winter genügt diese Hautatmung, um das Tier am Leben zu erhalten, wie einige Versuche im Freien bewiesen, wobei die Tiere wochenlang in Metalldrahtkäfigen unter Wasser gehalten wurden. Nach einigen Tagen ist der Luftvorrat verschwunden. Allerdings soll die Temperatur 8–10° nicht übersteigen, und obendrein dürfen auch die Ventilationsbewegungen nicht unmöglich gemacht werden. In Tabelle V finden sich einige Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle V. Sauerstoffaufnahme aus Wasser durch *Nepa* in cm³ O₂/K/Stunde. Temperatur 16°

Mit Luftvorrat und Ventilation . . .	152,5	(96,2–194,2)
Ohne Luftvorrat; Ventilation . . .	124,5	(101 -166,5)
Mit Luftvorrat; ohne Ventilation . .	82,5	(22 -142)
Ohne Luftvorrat; ohne Ventilation .	51,5	(32 - 62)

2. Die Plastronatmung. Ich erwähne die schönen Untersuchungen von THORPE und CRISP über die Plastronatmung nur sehr kurz, da THORPE¹ in den «Biological Reviews» diesen Atmungstyp gründlich besprochen hat.

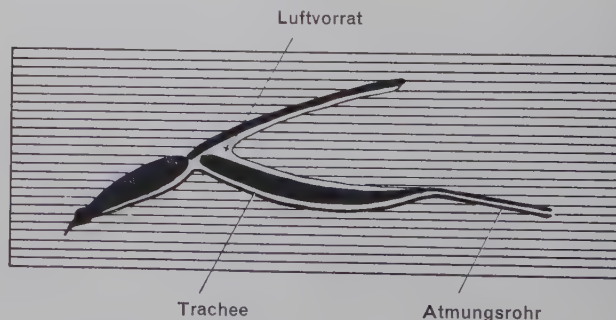


Abb. 4. Die Ventilationsbewegung von *Nepa*.

In den typischen Fällen, wie bei der Wanze *Aphelocheirus aestivalis* und den kleinen Käfern *Haemonia*

¹ W. H. THORPE, Biol. Rev. 25, 344 (1950).

und *Elmis*, handelt es sich um eine Gasschicht, die von schiefgestellten oder am Ende umgebogenen Haaren abgedeckt wird. Zwischen diesen eng nebeneinanderstehenden Haaren oder Haarenden, die hydrophob sind, befinden sich die winzigen Grenzflächen Gas-Wasser. Der Sauerstoffverbrauch und der Stickstoffverlust haben eine Druckerniedrigung in der Gasphase zurfolge. Das Wasser dringt etwas zwischen den Haaren ein, und es bildet sich eine gebogene Grenzfläche mit nach innen gerichteter Krümmung, wobei eine starke Erhöhung der Oberflächenspannung auftritt, welche einem weiteren Eindringen des Wassers vorbeugt. Der Festigkeitswiderstand der Haare und die Oberflächenspannung halten also dem von aussen kommenden Überdruck die Waage. Dies, zusammen mit dem Hineindiffundieren von Sauerstoff aus dem Wasser, ist die Ursache der Permanenz der physikalischen Kieme.

3. *Potamodytes tuberosus* HINTON, ein Wasserkäfer aus der Familie der *Elmidae*, lebt in den schnellströmenden Flüssen der Goldküste. STRIDE¹ hat beobachtet, dass in der Trockenzeit die Käfer sich in den schmalen Wasserrinnen des Flussbettes, wo die Stromstärke beträchtlich ist, ansammeln. Ihr Leib ist von einer sehr grossen Luftblase umgeben. Die Tiere brauchen nie an die Oberfläche zu kommen, um ihren Luftvorrat zu erneuern. Sie klammern sich an den Steinen fest, wobei der Kopf gegen den Strom, der an der Blase entlangstreicht, gerichtet ist. In der Luftblase herrscht ein von STRIDE¹ gemessener Unterdruck.

Die Erklärung dieser Erscheinung ist nach STRIDE¹ darin zu suchen, dass in der dem Tier entlangströmenden Grenzschicht der hydrostatische Druck sich etwas verringert (Gesetz von BERNOULLI) ebenso wie in einer Luftmasse, die an den Tragflächen eines Flugzeuges entlangstreicht. Einmal wird hierdurch das Auftreten eines Unterdrucks in der Luftblase erklärt (wobei also

diese Blase sich nicht verkleinert und verschwindet), und zum anderen soll in der Grenzschicht des Wassers eine Übersättigung mit Sauerstoff auftreten, wodurch eine Invasion dieses Gases in die physikalische Kieme gefördert wird.

Summary

The air stores carried by a number of aquatic insects have: a) a hydrostatic function (BROCHER, OORTWIJN-BOTJES, THORPE, and CRISP); b) the function of an oxygen store (EGE, DE RUITER *et al.*) and c) the function of a "physical gill" (STRAUSS-DURCKHEIM, EGE, etc.). The fact that oxygen is taken up from water with the aid of an air bubble was demonstrated for *Notonecta* by comparing the life time of insects with and without physical gill (while replenishing the oxygen store from the air was prevented) by EGE, and for *Corixa* by POPHAM, while VLASBLOM determined the oxygen uptake from water with and without air bubble for *Notonecta*, *Naucoris*, *Corixa*, *Sigara* and *Nepa*. *Nepa* and *Sigara* can take up considerable quantities of oxygen by cutaneous respiration.

During the summer, the gill function of the air store of *Notonecta* and *Naucoris* is of importance only when a water current passes along the animal, caused by ventilation movements of the legs (DE RUITER *et al.*). At low temperatures, however, the metabolic rate is so low that in many instances the physical gill provides the oxygen required without ventilation movements.

An apparatus for the simultaneous determination of oxygen uptake from air and water (WOLVEKAMP and VLASBLOM) gave results that provided a means of evaluating the importance of the physical gill function.

In some cases, the air store, although in direct contact with the water, does not need to be replenished. In *Aphelocheirus* and *Elmis*, the negative pressure in the bubble, caused by oxygen consumption and the diffusing out of part of the nitrogen, is compensated for by the mechanical resistance of a feltwork of thin hairs and the surface tension of the boundary layer of the water (THORPE and CRISP). In the African beetle, *Potamodytes*, the unprotected air bubble is permanent because the strong river currents produce a lowered pressure around the animal according to BERNOULLI's principle (STRIDE).

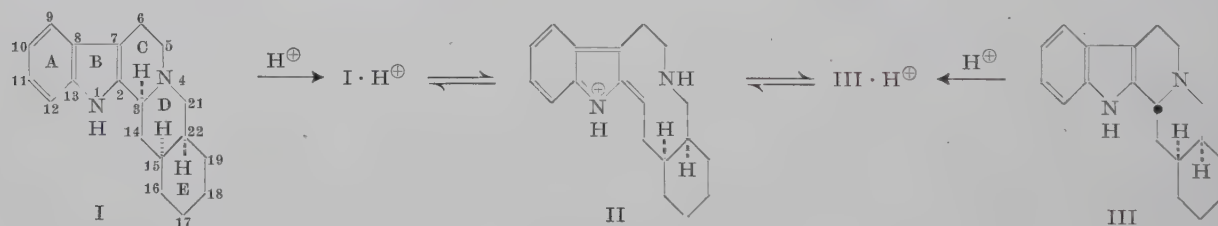
¹ G. O. STRIDE, Nature 171, 885 (1953).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Constitution of the Alloyohimbanes¹

While the stereochemistry of the ring skeleta of the alkaloids alloyohimbine², α -yohimbine² (rauwolscine³), 3-epi- α -yohimbine⁴, deserpidine⁴ and reserpine⁴ is based essentially on the assignment of an all-cis configuration to the hydrogenation product of the octadehydro-yohimbane sempervirine⁵ and of the synthetic Δ^3 -dehydro-alloyohimbane⁶, this formulation is somewhat in jeopardy because of the alkaline nature of the reducing medium⁷, and because of the fact that, as now can be reported, catalytic hydrogenation of sempervirine at pH 10 and 48 pounds pressure produced 55–66% *d,l*-alloyohimbane (I), m.p. 149–150° as well as 2,6% *d,l*-epialloyohimbane (III), m.p. 187–188°⁸. Despite their comparable energy content, both compounds possessing in their favorable conformations two axial and one equatorial bridgehead hydrogen atoms, I and III should be distinguishable by their different reactivity at C-3 and N^b. Thus their distinct difference in basicity: pK_a (in 80% methylcellulose) of 7.12, 7.13 for I and 7.48, 7.51 for III, the fact that III readily forms an amine oxide while I does not, and the fact that I can be dehydrogenated easily by palladium-maleic acid⁹ in sharp contrast to III strongly support the presently accepted structures of allo- and epiallo-yohimbane.



¹ The financial support of this work by Ciba Pharmaceutical Products Inc. is acknowledged gratefully.

² A. LEHIR, C. r. Acad. Sci. 254, 2613 (1952). - A. LEHIR, M. M. JANOT, and R. GOUTAREL, Bull. soc. chim. France 20, 1027 (1953).

³ A. CHATTERJEE and S. PAKRASHI, Naturwissenschaften 41, 215 (1954). - A. CHATTERJEE, A. K. BOSE, and S. PAKRASHI, Chem. and Ind. 1954, 491.

⁴ H. B. MACPHILLAMY, L. DORFMAN, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1071 (1955).

⁵ A. LEHIR, R. GOUTAREL, and M. M. JANOT, Bull. soc. chim., France 19, 1091 (1952).

⁶ G. STORK and R. K. HILL, J. Amer. Chem. Soc. 76, 949. (1954).

⁷ A. LEHIR, R. GOUTAREL, and M. M. JANOT, Bull. soc. chim., France 19, 1091 (1952). - For a discussion of the change of the stereospecificity of catalytic hydrogenation with pH see A. L. WILDS, J. A. JOHNSON, Jr., and R. E. SUTTON, J. Amer. Chem. Soc. 72, 5524 (1950).

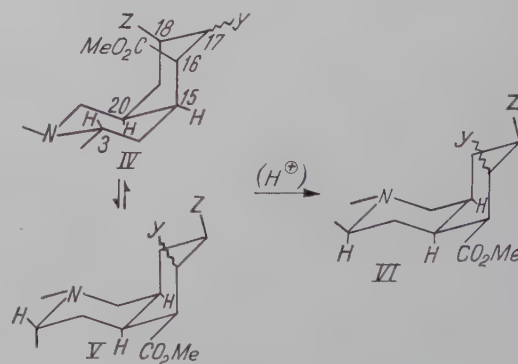
⁸ The authors wish to thank Professor STORK for kindly sending them samples of the above two compounds for mixed melting point determination.

⁹ R. MAJIMA and S. MURSHASHI, Proc. Imp. Acad. (Tokyo) 10, 341 (1934). - The Majima method of ring C dehydrogenation has been found to be of general applicability and hence more useful than the lead tetracetate procedure.

Because of the importance of recent C-3 epimerisations in the alkaloid series¹, similar studies were undertaken on compounds I and III. Conc.-hydrobromic-acetic acid treatment of *either* isomer, proceeding by way of C(3)-N^b bond rupture (cf. II), yielded $74 \pm 5\%$ of a mixture containing $78 \pm 1\%$ III. On the other hand alkaline treatment of *either* compound under Huang Minlon conditions produced 78% of a mixture containing only 4% of isomerised amine. Increased basicity of the medium enhanced the conversion as well as the destruction of the compounds. These results signify that only acid-catalysed epimerisations readily attain equilibrium, and that only this type of data can be used safely as criterion for configurational assignments of the alkaloids.

The acid-induced conversion of deserpidine and reserpine to their allo epimers¹ clearly demonstrates that the alkaloids contain axially oriented C-16 and C-18 substituents (IVa) or preferably an axial C(2)-C(3) linkage (Va) while the allo compounds possess the more thermodynamically stable configuration VIa. The intramolecular formation of a quaternary ammonium salt from methyl reserpate 18-tosylate under essentially solvolytic conditions (collidine or dimethylformamide)² suggests strongly neighboring group participation by the 17-methoxyl in displacement and perhaps also elimina-

tion reactions at C-18. This requirement makes an all-trans arrangement of ring E substituents mandatory

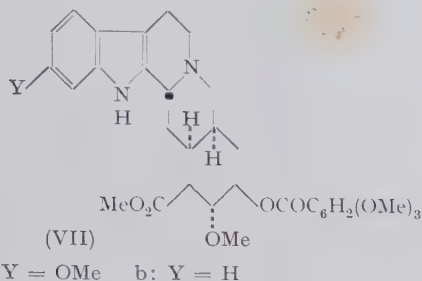


a Y = OMe, Z = OCOC₆H₄(OMe)₃ b Y = OH, Z = H

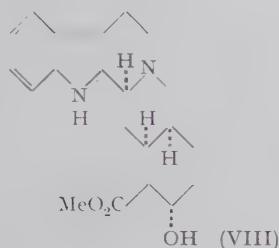
¹ H. B. MACPHILLAMY, L. DORFMAN, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1071 (1955).

² P. A. DIASSI, F. L. WEISENBORN, C. M. DYLLION, and O. WINTERSTEINER, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2028 (1955).

and limits the structure of reserpine and deserpidine to VII a and b.



The acid-catalysed 3-epi- α -yohimbine-to-rauwolscine transformation¹ indicates that the former has an axial carbomethoxy group (IV b) or an axial C(2)-C(3) linkage (Vb) while in the latter both functions are equatorially directed. The demethylation of deserpidinol to rauwolscinyl alcohol¹, with little likelihood of inversion at C-17, also points to a trans relationship of ring E substituents in α -yohimbine (VIII) and its C-3 epimer².



E. WENKERT and LIANG H. LIU

Department of Chemistry, Iowa State College, Ames, (Iowa), June 17, 1955.

Zusammenfassung

Die zur Zeit angenommene stereochemische Formulierung von allo-Yohimban wird durch die Tatsache gestützt, dass epi-allo-Yohimban (III) eine stärkere Base als allo-Yohimban (I) ist. Ferner bildet III ein Aminooxyd, während I dies nicht tut. I wird katalytisch erheblich leichter zu einer quaternären Verbindung dehydriert als III. Zwischen I und III bildet sich ein säurekatalysiertes Gleichgewicht, das 78,7% III enthält. Diese Ergebnisse und eine neue Interpretierung der Verwandlung von Reserpsäuremethylestertosylat in eine quaternäre Ammoniumverbindung deuten darauf hin, dass dem Reserpin und dem Deserpidin die sterische Formel VII zukommen muss.

¹ H. B. MACPHILLAMY, L. DORFMAN, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1071 (1955).

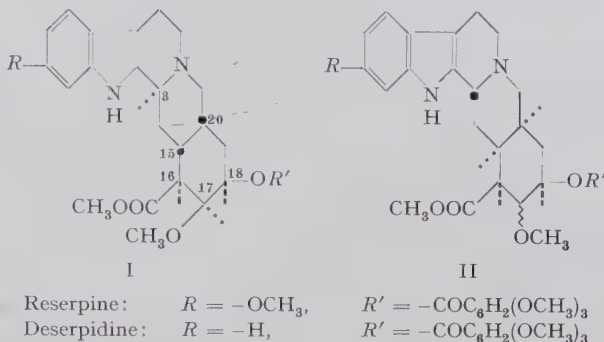
² Previous discussions of the configuration of alkaloids of the allyohimbane type have been based on ambiguous steric hindrance phenomena³ and on one case⁴ on a non-existent di-chair cis-decahydroisoquinoline conformation.

³ A. LEHIR, M. M. JANOT, and R. GOUTAREL, Bull. soc. chim. France 20, 1027 (1953). – A. CHATTERJEE and S. PAKRASHI, Naturwissenschaften 41, 215 (1954).

⁴ A. CHATTERJEE, A. K. BOSE, and S. PAKRASHI, Chem. and Ind. 1954, 491.

Rauwolfia Alkaloids XXI. The Stereochemistry of Reserpine and Deserpidine

We have provisionally favored the stereochemical formula I for reserpine and deserpidine¹. A recently reported experimental finding has been interpreted by another group of investigators² to indicate a similar formula. However, certain new facts have been obtained which establish the expression II as more nearly representing the stereochemistry of these alkaloids.



It had previously been assumed that the driving force for the epimerization reaction at C-3 of reserpine and its derivatives and derivatives of deserpidine resided in the greater inherent stability of the allyohimbane over the 3-epialloyohimbane skeleton³. However, further investigations revealed that the allo- and 3-epialloyohimbane without asymmetric substitution at C-16, C-17 or C-18 under conditions of the isomerization are of approximately equal stability. For example, methyl anhydroreserpate⁴ which must possess the allo configuration since it may be obtained from methyl 3-isoreserpate tosylate as well as from the normal tosylate, on treatment with acid, gives 11-methoxy-3-epialloyohimbane [m.p. 240–243°; $[\alpha]_D^{25} + 72^\circ$ (chloroform). Calculated for $C_{20}H_{24}N_2O_2$: C, 74.04; H, 7.46; N, 8.64. Found: C, 73.88; H, 7.57; N, 8.49] as well as the previously described 11-methoxyallyohimbane (reserpone)⁵ in a ratio of 3 to 2. Furthermore it has been shown⁶ that the composition of the system 3-epialloyohimbane-allyohimbane at acid attained equilibrium is 3:6 to 1.

The reason for the complete epimerization of reserpine and its derivatives and certain derivatives of deserpidine must therefore lie in the steric relationship of the substituents in ring E. On the basis of I, the iso compounds (conformation IIIa) with 1,3-diaxial interactions not possessed by the normal compounds would be the less stable rather than the more stable of the pairs of epimers. However, the expression II (conformation IVa) gives

¹ H. B. MACPHILLAMY, L. DORFMAN, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1071 (1955).

² P. A. DIASSI, F. H. WEISENBORN, C. M. DYLION, and O. WINTERSTEINER, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2028 (1955).

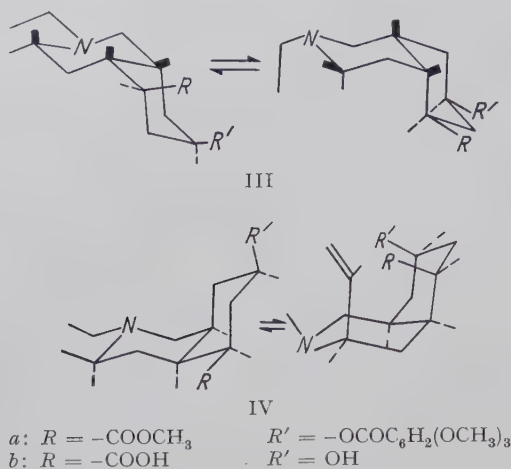
³ A. CHATTERJEE, A. K. BOSE, and S. PAKRASHI, Chem. and Ind. 1954, 491.

⁴ L. DORFMAN, A. FURLENMEIER, C. F. HUEBNER, R. A. LUCAS, H. B. MACPHILLAMY, J. M. MUELLER, E. SCHLITTLER, R. SCHWYZER, and A. F. ST. ANDRÉ, Helv. chim. Acta 37, 59 (1954).

⁵ C. F. HUEBNER, H. B. MACPHILLAMY, A. F. ST. ANDRÉ, and E. SCHLITTLER, J. Amer. Chem. Soc. 77, 472 (1955).

⁶ E. WENKERT and L. H. LIU, J. Amer. Chem. Soc. (in press). – We are indebted to Prof. WENKERT for communication of this fact to us before publication.

a clear explanation for the greater stability of the iso compounds.

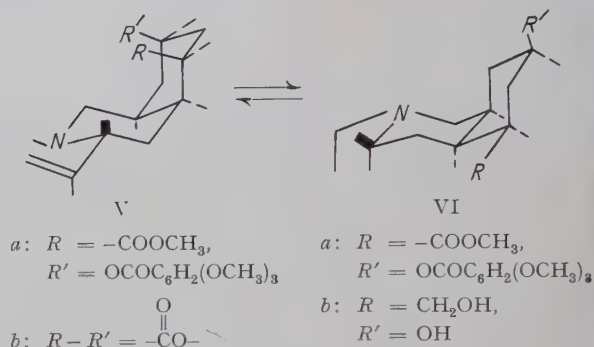


Further, 3-iso-reserpine (as the nitrate) [m. p. 266 to 270°]. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{HNO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 54.88; H, 6.49; N, 8.73. Found: C, 55.07; H, 6.32; N, 9.01 on treatment with acetic anhydride-pyridine yielded an O-acetyl amino acid rather than a lactone as is obtained from reserpine acid hydrochloride. This amino acid with diazomethane gave methyl 3-iso-reserpate acetate¹. On the basis of I, 3-iso-reserpine acid possessing the conformation IIIb should readily lactonize whereas the new expression II (conformation IVb) for the iso compound would explain the greater difficulty encountered in lactone formation. Existence of the ring conversion isomer of IVb possessing substituents at C-16 and C-18 in the axial orientation required for closure to the lactone ring can be seen to be extremely unlikely in contrast to its counterpart IIIb. Lactone formation of IVb could, of course, also occur by transformation of ring E in one of its conversion isomers to the boat conformation but this requires extra energy and is not necessary in IIIb.

The absolute configuration established by KLYNE² for yohimbine indicates that the hydrogen at C-3 is in the α orientation. The contribution of such an axial hydrogen is shown by the differences in molecular rotation between a series of three yohimbane derivatives and their corresponding tetrahydro compounds. The values vary from -586° to -602° . The difference between a series of three allo-yohimbane derivatives and their corresponding tetrahydro derivatives are likewise highly negative (-267° to -690°). Therefore, the hydrogen at C-3 in allo-yohimbane is α and 3-epi-allo-yohimbane possesses the absolute configuration at C-3, C-15 and C-20 indicated in II. This implies that the stereochemistry of allo-yohimbane (C-3, C-15, C-20 cis) as indicated by LE HIR *et al.*³ and STORK *et al.*⁴ is accepted. By application of Hudsons lactone rule (KLYNE⁵) the groups at C-16 and C-18 are oriented in the β position in reserpine⁶ and deserpidine (Δ lactone-acid = +641 [pyridine])¹ which

leads to II as the absolute configuration of these alkaloids.

Reserpine in solution can be regarded as an equilibrium mixture of the two ring conversion isomers Va and VIa based on the trans-anti-cis and cis-anti-cis ring skeletons with the latter being energetically preferred. The predominance of VI is also indicated by the behavior of reserpine acid lactone (Vb) which is locked in the trans-anti-cis conformation and reserpinediol (VIb) towards catalytic dehydrogenation over palladium using maleic acid as a hydrogen acceptor¹. The lactone is recovered in 70% yield under conditions which give a quantitative yield of tetrahydroreserpinediol. Access of the hydrogen atom at C-3 in Vb to the catalyst surface would be expected to be somewhat hindered.



Clear cut evidence for the configuration at C-17 is not at hand since reactions involving this center can be variously interpreted. However, α -orientation of the methoxyl seems preferable because, among other reasons, β -orientation of this group would make formation of the quaternary salt from methyl reserpate tosylate² sterically difficult. We are indebted to Dr. D. PRINS for pointing this out to us³.

C. F. HUEBNER, H. B. MACPHILLAMY,
E. SCHLITTLER, and A. F. ST. ANDRÉ

Research Department, CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit, New Jersey, June 2, 1955.

Zusammenfassung

Für Reserpin und Deserpidin wird eine neue stereochemische Formulierung vorgeschlagen, die auf folgenden experimentellen Befunden beruht:

1. Reserpin- und Deserpidinderivate epimerisieren als 3-Epialloverbindungen vollständig zu den entsprechenden Isoverbindungen. Im Gegensatz dazu epimerisieren einfachere 3-Epialloyohimbane (ohne Substituenten in 16, 17 und 18-Stellung) zu einer Mischung von normaler und iso-Verbindung. Beide Isomere scheinen in diesem Fall ungefähr gleiche Stabilität zu besitzen.

2. Im Gegensatz zu Reserpsäure bildet iso-Reserpsäure kein Laktone.

3. Interpretation der Drehungswerte deutet darauf hin, dass das H-Atom in Stellung 3 und die Substituenten in Stellung 16 und 18 β -Orientierung besitzen.

¹ R. MAJIMA and S. MURAHASHI, Coll. Papers Fac. Sci. Osaka 2, 341 (1935).

² P. A. DIASSI, F. H. WEISENBORN, C. M. DYLION, and O. WINTERSTEINER, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2028 (1955).

³ Prof. E. VAN TAMELEN has kindly given us a copy of a manuscript on the stereochemistry of reserpine prior to publication. The invalidity of I is pointed out and II is mentioned as one of two possibilities for the new representation of reserpine.

¹ Paper XIX, H. B. MACPHILLAMY, C. F. HUEBNER, E. SCHLITTLER, A. F. ST. ANDRÉ, and P. R. ULSHAFFER, J. Amer. Chem. Soc. (in press).

² W. KLYNE, Chem. and Ind. 1954, 1032.

³ A. LE HIR, R. GOUTAREL, and M. M. JANOT, C. r. Acad. Sci. 235, 63 (1952).

⁴ G. STORK and R. K. HILL, J. Amer. Chem. Soc. 76, 949 (1954).

⁵ W. KLYNE, Chem. and Ind. 1954, 1198.

⁶ P. A. DIASSI, F. H. WEISENBORN, C. M. DYLION, and O. WINTERSTEINER, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2028 (1955).

Heats of Neutralization
of Fructose-1,-6,-diphosphate

The heats of neutralization of fructose-1,-6,-diphosphate were determined in two experiments. The apparatus was a simple "students assembly" consisting of a 1/2 liter Dewar flask and BECKMANN thermometer. The sodium hydroxyde solution was admitted suddenly into the fructose diphosphate solution in the Dewar flask. The temperature trends were noted before and after neutralization and extrapolated in the usual manner. Control determinations on phosphoric acid were all within 4 % of the data in LANDOLT-BÖRNSTEIN. The results on fructose diphosphate were 14.7 resp. 14.9 Cal/Mole for the primary and 14.0 resp. 13.5 Cal/Mole for the secondary hydrogen ions. The free acid was prepared from freshly purified Ba-salt by reaction with the calculated amount of sulfuric acid. The solution was roughly 0.02 molar and it was neutralized with sodium hydroxide.

The experiments were originally designed to compare the heats of neutralization with the corresponding ones of phosphoric acid: 14.8 Cal/Mole for the primary and 12.2 Cal/Mole for the secondary hydrogen ion. It was thought possible that electrostatic repulsion between the two ionized phosphoric acid groups on the same molecule might cause an appreciable decrease in heat of neutralization, but actually a slight but significant increase was observed for the secondary hydrogen ions. Irrespective of speculations, however, the approximate determination of these heats of neutralization may be interesting enough to warrant their publication.

F. KÖRÖSY

Délibáb út. 28, Budapest, August 2, 1954.

Zusammenfassung

Es wurde geprüft, ob die Neutralisationswärmen der beiden ionisierten Phosphatgruppen von Fructose-diphosphat durch deren elektrostatische Wechselwirkung beeinflusst werden. Dabei ergab sich für die primären H⁺-ionen kein Unterschied gegenüber Phosphorsäure, für die sekundären H⁺-ionen dagegen eine geringe Erhöhung der Neutralisationswärme.

Les transformations des nucléoides
de *Escherichia coli* déclenchées par les rayons X

Nous avons décrit précédemment les transformations subies par la cellule bactérienne, en particulier par son appareil nucléaire (nucléoides) après irradiation ultraviolette¹. Les cellules s'allongent, les nucléoides deviennent polychromosomiques et ensuite fragmentés; 30 min déjà après l'irradiation, toutes les cellules présentent, d'une façon très homogène, des nucléoides fragmentés. La différence entre les bactéries survivantes et les mortes ne devient visible que 60 à 90 min (selon la dose d'UV.) après l'irradiation. Des doses d'UV. très faibles, tuant moins de 10 % de la population, ont toujours cette même action sur les nucléoides pendant les

20 min qui suivent l'irradiation: les cellules s'allongent et le noyau est polychromosomique. Les fortes doses (survie de moins d'1 %) retardent ou empêchent la transformation caractéristique; les nucléoides sont alors simplement mal définis («diffus»).

Nous nous sommes proposé d'étudier l'action des rayons X sur les nucléoides bactériens pour savoir si ce rayonnement ionisant provoque les mêmes transformations que les UV. qui ne peuvent qu'exciter les molécules. Il était intéressant en particulier de comparer l'action des deux rayonnements sur les cellules lysogènes, car les rayons X n'induisent la production de phages que sur 50 % au plus des cellules lysogènes (LATARJET¹), alors que les rayons UV. induisent plus de 99 % de la population (WEIGLE et DELBRÜCK²).

Les nucléoides ont été observés au microscope électronique selon la méthode décrite ailleurs³. Les souches *E. coli* B non lysogène, K12 (λ), lysogène pour le phage λ, et K12S non lysogène et sensible au phage λ, ont été étudiées. Les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'à une densité de 3 à 5.10⁸ cellules par millilitre; après avoir été centrifugées, elles sont resuspendues dans du milieu frais à 4°C et exposées aux rayons X d'une longueur d'onde moyenne de 0,9 Å (Anticathode Molybdène, 33 kV, filtre Al). Elles sont ensuite diluées dans du milieu frais à 37 °C et cultivées. Le graphique montre les courbes de survie en fonction de la dose de rayons X en röntgen (r) pour les trois souches. Nous y avons indiqué, en pointillé, le pourcentage de cellules K12 (λ) induites, c.-à-d. productrices de bactériophages.

Les résultats de l'examen morphologique sont les suivants:

- a) les trois souches se comportent – grosso modo – de façon identique;
- b) les nucléoides polychromosomiques respectivement fragmentés se retrouvent toujours sur une partie au moins de la population;
- c) deux nouvelles transformations apparaissent pour les doses relativement fortes, transformations qui sont spécifiques pour les rayons X.

Doses faibles: 800–2500 r, survie 90 % à 100 %. La figure 1 montre les nucléoides de *E. coli* B a) en croissance normale, b) 30 min après irradiation aux rayons X avec 800 r. On voit que cette faible dose a suffi pour provoquer une transformation vers la polychromosomie dans la plupart des cellules.

La figure 2 montre des cellules 60 min après une irradiation avec 2500 r. On voit un allongement et une polychromosomie très marqués aussi bien sur K12S (fig. 2a) que sur B (fig. 2b). Si l'on continue à cultiver, les nucléoides se regroupent et les cellules allongées se divisent en cellules à appareil nucléaire normal.

Doses moyennes: 2–4.10⁴ r, survie entre 10 et 1 %. La figure 3 montre l'évolution de K12 (λ) après une irradiation de 2.10⁴ r. 15 min après l'irradiation (fig. 3a), nous trouvons des cellules polychromosomiques et des cellules aux nucléoides fragmentés, mais aussi d'autres dans lesquelles les fragments sont très rapprochés et forment une vésicule centrale (ou polaire, dans le cas d'une division amorcée). 30 min après l'irradiation, la fragmentation du noyau est particulièrement bien visible dans les cellules allongées qui se différencient nettement des cellules plus courtes à noyau vésiculaire (fig. 3b). 60 min après l'ir-

¹ R. LATARJET, Ann. Inst. Pasteur 81, 389 (1952); communications personnelles.

² J. WEIGLE et M. DELBRÜCK, J. Bact. 62, 301 (1951).

³ E. KELLENBERGER, Exper. 8, 99 (1952); Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

¹ E. KELLENBERGER, Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

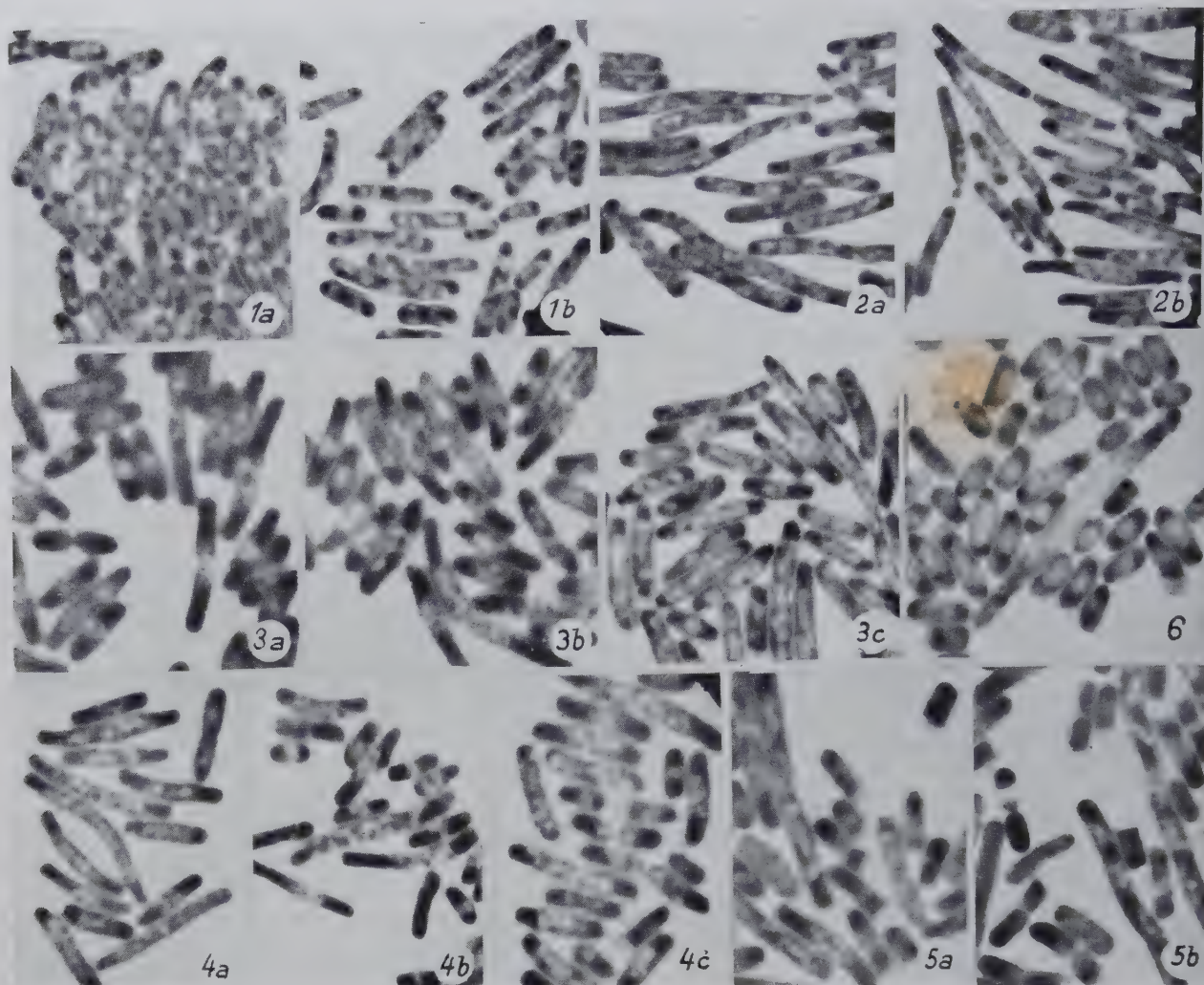


Fig. 1. Les nucléoïdes de *E. coli* B: a) sans irradiation; b) après irradiation de 800 r.

Fig. 2. Irradiation faible de 2500 r: a) sur *E. coli* B, observé après 60 min de culture; b) *E. coli* S, observé après 30 min de culture.

Fig. 3. *E. coli* K12 irradié avec $2 \cdot 10^4$ r, observé: a) après 15 min; b) après 30 min; c) après 60 min de culture.

Fig. 4. *E. coli* S irradié avec $2 \cdot 10^4$ r, observé: a) après 30 min; b) après 60 min de culture; c) après 90 min de culture.

Fig. 5. *E. coli* B irradié avec 10^5 r, observé: a) après 30 min; b) après 60 min.

Fig. 6. *E. coli* B irradié avec 10^6 r, observé après 60 min de culture.

radiation, les fragments paraissent déjà se réarranger et on retrouve des cellules d'apparence normale, tandis que les cellules à noyau vésiculaire ne changent pas d'aspect. Cette évolution est essentiellement la même pour K12 S et B, à part de petites différences de proportion entre les deux sortes de transformations décrites. La figure 4a montre des cellules K12 S, 4b des cellules B 30 min après l'irradiation avec $2 \cdot 10^4$ r. On remarquera dans cette dernière figure l'abondance des petites cellules à noyau vésiculaire.

Doses fortes: 10^5 et 10^6 r, survie moins que 1%. Les fortes doses ont été étudiées sur les cellules B uniquement. La figure 5 montre l'évolution des cellules après une irradiation de 10^5 r. Une certaine proportion des cellules sont allongées et portent des noyaux fragmentés. Dans d'autres cellules nous retrouvons la contraction des fragments en vésicules centrales. Une troisième sorte de transformation enfin fait son apparition avec ces doses: nous trouvons des vacuoles polaires, desquelles nous ne pouvons pas dire si elles contiennent le matériel nucléaire. 60 et 90 min après l'irradiation (fig. 5b et c), l'image s'accroît: on voit quelques cellules très longues dans

lesquelles les fragments nucléaires commencent à se regrouper en noyaux normaux. L'irradiation de 10^6 r enfin (fig. 6) ne produit plus que de rares cellules allongées, par contre il y a ici abondance de cellules à noyaux vésiculaires et de nombreuses cellules avec vacuoles.

De ces observations il ressort clairement, que les rayons X peuvent déclencher trois transformations distinctes. Une première action, visible surtout après les faibles doses et sur des cellules survivantes, s'apparente fortement à celle produite par les rayons ultraviolets: la cellule s'allonge jusqu'à 2–4 fois sa longueur normale et les noyaux deviennent polychromosomiques et même fragmentés. Une deuxième action, qui semble se superposer à ce premier effet tend à concentrer le matériel nucléaire en un seul noyau vésiculaire. Elle est visible à des doses plus fortes et n'apparaît clairement qu'après un temps de culture prolongé. Contrairement à la fragmentation, qui peut être réversible puisqu'elle se trouve aussi sur des bactéries qui vont survivre, cette lésion qui provoque la forme vésiculaire du noyau est très probablement létale. Une troisième action enfin,

sur des bactéries très fortement irradiées, provoque la formation de vacuoles polaires.

Si l'on calcule¹ le nombre de traces de ionisations formées par les rayons X qui se trouvent entièrement ou en partie dans la cellule, on obtient 160 traces par cellule pour la dose 6,10³ r. A cette dose nous trouvons une survie de 37 % des bactéries, ce qui veut dire – d'après la théorie du coup efficace – que sur les 160 traces par cellule il y a en moyenne une seule qui est létale. A 800 r, donc avec environ 20 traces par cellule, on observe déjà la transformation des nucléoides vers la fragmentation. L'étendue de cette transformation dépend de la dose: pour de faibles doses, elle ne dépasse souvent pas le stade de la polychromosomie pour retourner ensuite au regroupement de nucléoides normaux. A des doses plus fortes, ce retour ne s'effectue plus ou seulement après un long développement à nucléoides fragmentés. Par conséquent on doit admettre que cette fragmentation ne soit pas l'effet d'un seul coup efficace, mais soit due à une substance produite ou détruite en plus ou moins grande quantité selon la dose. Cette substance serait responsable du désordre au niveau des divisions nucléaires, dont l'expression visible est la polychromosomie et la fragmentation.

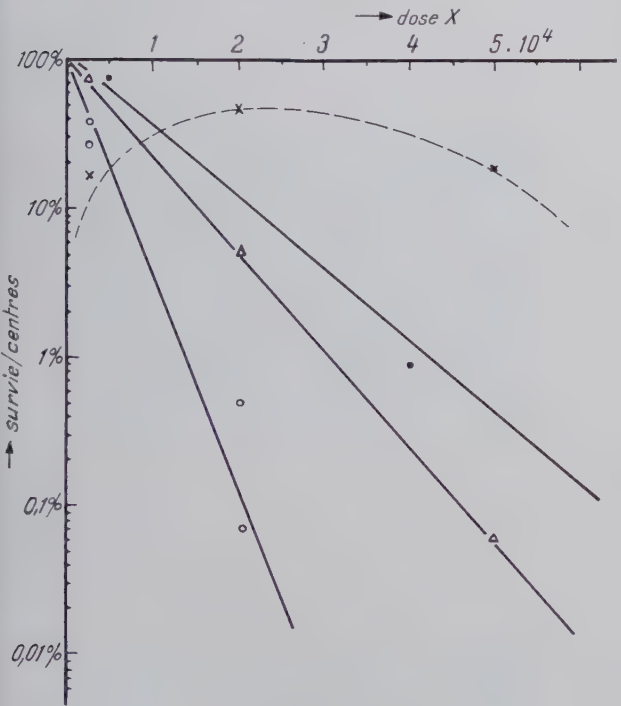


Fig. 7.

Quant à l'induction, nous avons montré² que la fragmentation n'est pas produite par le phage induit. Mais tous les inducteurs connus pour K12(λ) – Dichlorène³, H₂O₂³, rayons ultraviolets et X – provoquent la fragmentation des noyaux, que la cellule soit lysogène ou pas. Les rayons X, avec lesquels on peut induire au maximum 50 % de la population, ne produisent en même temps la fragmentation que sur la moitié des cellules,

l'autre moitié montrant des noyaux vésiculaires. Tout se passe comme si la fragmentation du noyau était une condition nécessaire, si non la cause de l'induction: le désordre nucléaire augmenterait la probabilité d'induction. Néanmoins, sur la base des expériences mentionnées, on ne peut pas exclure la possibilité que la fragmentation soit un phénomène totalement étranger à l'induction, accompagnant fortuitement cette dernière.

Nous exprimons toute notre gratitude au D^r R. LATARJET qui nous a proposé cette étude et qui nous a offert la possibilité de faire les irradiations dans son laboratoire de l'Institut du Radium à Paris. Nous remercions également le D^r MARCOVICH pour ses indications précieuses et M. MORENNE pour avoir effectué les irradiations.

E. KELLENBERGER

Département de Biophysique, Institut de Physique de Université de Genève, le 29 avril 1955.

Summary

In order to obtain further knowledge on the action of radiation on living cells we studied the nuclear transformations of *E. coli* after exposure to X-rays. Three different phenomena could be observed: One is producing the polychromosomal form of nucleoids, and is reversible. The second, which is probably a rapid lethal effect, expresses himself by the vesicular form of the nucleoids. The third is only concerned with very high doses. The hypothesis, that the fragmentation of nucleoids may be directly related to induction of lysogenic cells is postulated.

Histochemischer Nachweis der im Zytoplasma regenerativ nach P-Mangelzüchtung auftretenden phosphatischen Überkompensation

Durch chemische Modellversuche, die in einer systematischen Entwicklungsreihe von uns dargestellt wurden, konnten wir auf Grund eindeutiger Reaktionen nachweisen¹, dass mit den gebräuchlichen histochemischen Methoden (MEYER², UNNA-PAPPENHEIM³, LINDEGREN⁴, SCHUMACHER⁵), welche bis dahin allgemein in der Zellphysiologie zur Lokalisation der freien Nukleotide im Zytoplasma dienten, entweder lediglich eine diffuse Färbung oder bestenfalls eine Indikation der Basophilie bestimmter Zell- und Gewebsorte erreicht wird. Nicht einmal die Zellphosphate lassen sich auf diese Weise spezifisch erfassen, um so weniger noch die freien Nukleinsäuren, deren zytochromatische Identifizierung hiernach in früheren Arbeiten zweifelhaft erscheinen muss.

Der spezifische Nachweis der Zellphosphate, sofern sie mindestens zwei freie Valenzen besitzen, ist erst durch die Anwendung des letzthin von uns ausgearbeiteten M-T-Verfahrens¹ ermöglicht worden, dessen Selektivität auf dem Prinzip der Doppelfärbung mit Methylen-

¹ D. A. LEA, *Actions of Radiations on living cells* (Cambridge University Press, 1947).

² E. KELLENBERGER, Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

³ F. JACOB, C. r. Acad. Sci. 234, 2238 (1952). – E. KELLENBERGER, Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

⁴ B. ROMEIS, *Mikroskopische Technik* (Leibnitz-Verlag, München 1948), S. 170. – A. PAPPENHEIM, *Fol. haem.* 6, 51 (1924).

⁵ C. C. LINDEGREN, *Nature* 159, 63 (1947).

⁶ J. SCHUMACHER, *Zbl. Bakteriol.* 73, 337 (1922); 77, 191 (1924); *Chemie der Zelle und Gewebe* 12, 175 (1926).

⁷ Gemeinschaftsarbeit von F. WINDISCH und D. STIERAND sowie von H. HAEHN, *Protoplasma* 42, 346 (1953).

blau und Trypaflavin nebst zweifacher Säuredifferenzierung beruht. Aus der gepaarten Reaktion der beiden Anilinpigmente am freien Phosphatkomplex leitet sich der spezifische Effekt ab, welcher der M-T-Methode ihre indikative Bedeutung verleiht. Durch zahlreiche Tinktionsversuche, ausgeführt an adäquaten P-Substanzen und verschiedenartigen Mikroorganismen (Hefen, Bakterien), konnten wir nachweisen, dass sich die Zellphosphate – infolge der dem M-T-Prinzip inhärenten Eliminationswirkung – von den unspezifischen Faktoren der Plasmafärbung exakt abgrenzen und auf diese Weise chromatisch lokalisieren lassen. Verfahrenstechnisch gelangten wir dahin, dass wir völlig intakte Zellen, ohne destruirende und denaturierende Fixierung, dem M-T-Test zugänglich machen konnten, was gegenüber der Manipulation mit Artefakten zweifellos eine biometrische Verbesserung bedeutet.

Im Rahmen unserer laufenden Untersuchungen über den Phosphat- und Nuklealstoffwechsel wurde gelegentlich von uns die M-T-Methode analytisch einbezogen, um auch, wenn möglich, von der histochemischen Seite her, das heisst *in den Zellen selbst* dem Mechanismus des Phosphatwechsels zwischen Substrat und Plasma näherzukommen. Bei dieser Gelegenheit machten wir die sinnfällige Beobachtung, dass ein mit gleicher Intensität bisher noch nicht erreichter M-T-Effekt (säureresistente Grünfärbung) im Hefeplasma auftritt, wenn die Testorganismen zunächst einer über mehrere Passagen sich erstreckenden P-Mangelzüchtung ausgesetzt und daraufgehend einer regenerierenden Behandlung mit primärer Kaliumphosphatlösung bzw. Malzwürze unterworfen werden.

Die P-Hungerhefe zeichnet sich, wie wir in einer grossen Reihe von Versuchen reproduzierbar bestätigt fanden, durch die signifikante Eigenschaft aus, dass sie im initialen Stadium der Regenerierung begierig Phosphat in sich aufnimmt und dabei eine *phosphatische Überkompensation* erfährt, die nach relativ kurzer Reaktionsdauer kulminiert und dann allmählich wieder bis auf das normale Niveau abklingt. Dieses äusserst markante Stoffwechsel-Phänomen, das uns zuerst plasmochromatisch entgegentrat, ist aber nicht nur auf zytologische Art nachweisbar, sondern lässt sich auch chemisch durch Bestimmung des Gesamt-P-Gehaltes erfassen. In letzterer Hinsicht liegt bereits ein nicht ganz einheitliches Zahlenmaterial von WIAME¹ sowie von RAUTANEN und MJIKKULAINEN² vor. Soweit sich jedenfalls aus unseren eigenen analytischen Ermittlungen ersehen lässt, steht der M-T-Befund, der sich auf stark kontrastierende Tinktionseffekte stützt, in proportionalem Einklang mit der zellularen Phosphataufnahme.

Gestützt auf das histochemische Kriterium der phosphatischen Überkompensation, gelang es uns in weiteren Untersuchungen, die in Gemeinschaft mit HERFURT und RÜHLE an anderer Stelle³ veröffentlicht werden, gewissen Einblick in den bisher noch ungeklärten Mechanismus des Phosphatwechsels zwischen Substrat und Plasma zu gewinnen. Mit grosser Deutlichkeit trat hierbei zutage, dass das Eindringen von Phosphat durch die Zellmembran nicht ausschliesslich auf Grund eines einfachen Diffusionsprozesses erklärt werden kann, sondern irgendwie mit den Phosphorylierungsreaktionen verknüpft sein muss, was bereits von LANG⁴ in Erwägung

gezogen und von HOLZER¹ aus experimentellen Feststellungen gefolgert wurde.

Als zytologischen Beleg der von uns festgestellten phosphatischen Überkompensation nach vorheriger P-Hungerzüchtung bringen wir nachstehend vier Mikrobilder, die auf Farbfilm hergestellt sind, aber vorerst schwarz-weiss zur Reproduktion gelangen (eine spätere Veröffentlichung im Originalfarbdruck ist vorgesehen).

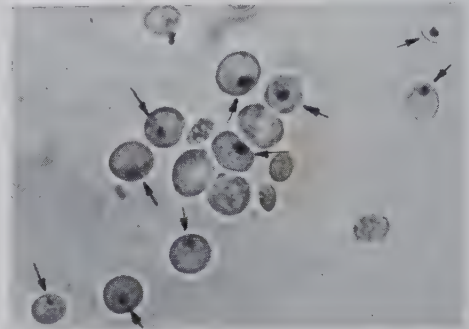


Abb. 1. Normale Unterhefe U, M-T-Färbung. 600fache Vergrösserung

Abbildung 1 zeigt die normale Ausgangshefe (Unterhefe, Rasse U), welche aus einer üblichen Würzezüchtung stammt und bei der M-T-Reaktion, wie durch

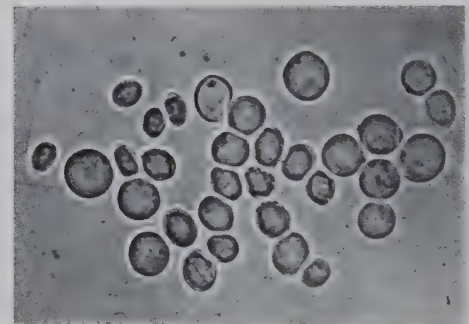


Abb. 2. P-Mangelhefe, Methylenblaufärbung. 600fache Vergrösserung

Pfeile angedeutet, scharf abgegrenzte Granula (im Original sattgrün) auf farblosem Plasmagrund hervortreten lässt, deren Anzahl und Grösse jedoch relativ gering ist.

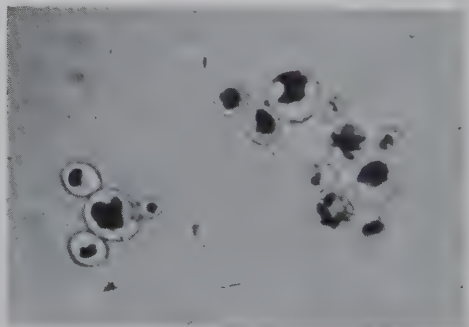


Abb. 3. Regenerierte P-Mangelhefe, Methylenblaufärbung. 600fache Vergrösserung.

Mit Hilfe der alleinigen Methylenblaufärbung (ausdifferenziert) treten zunächst ausgeprägtere Konturen in

¹ J. M. WIAME, J. Biol. Chem. 178, 919 (1949).

² N. RAUTANEN und P. MJIKKULAINEN, Acta Chem. Scand. 5, 89 (1951).

³ F. WINDISCH, E. HERFURT und G. RÜHLE, Z. Naturf. 10b, 254 (1955).

⁴ K. LANG, Der intermediäre Stoffwechsel (Springer-Verlag Berlin, 1952), S. 47.

¹ H. HOLZER, Biochem. Z. 324, 144 (1953).

Erscheinung, die sich bei der zweiten Säurebehandlung wieder erheblich reduzieren. Wird nun dieselbe Hefe über mehrere Passagen phosphatarm gezüchtet und

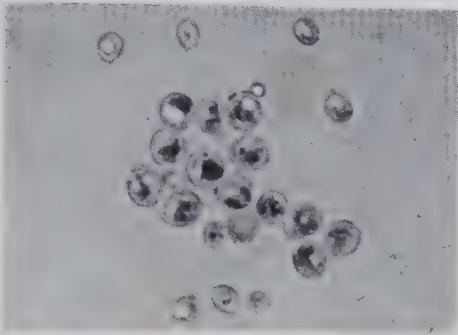


Abb. 4. Regenerierte P-Mangelhefe, M-T-Färbung. 600fache Vergrößerung.

danach, im P-verarmten Zustand, mit Methylenblau gefärbt, so entsteht nur eine blasse, schieferblaue Tönung, die bei anschließender Säuredifferenzierung schnell und restlos gelöscht wird (Abb. 2). Im stärksten Gegensatz hierzu kommt indessen – massig und farbsatt (im Original tiefblau) – der Tinktionseffekt mit Methylenblau zur kontrastreichen Geltung (Abb. 3), wenn sich die Hungerhefe – während einer etwa zwei-stündigen Regenerierung in Würze – bis weit über die Grenze der normalen Sättigung mit Phosphat gemästet hat. Auch bei vollständiger M-T-Färbung mit zweifacher Säuredifferenzierung ist die plasmochromatische Indikation noch äusserst charakteristisch (Abb. 4). Beim Vergleich der Abbildungen 1 und 4 wird die markante Zellreaktion der phosphatischen Überkompensation in ihrer bioanalytischen Bedeutung überzeugend erkennbar.

Dem dargelegten zytochromatischen Befund lassen wir, in tabellarischer Zusammenfassung, einige vergleichende Messwerte folgen, welche in engster Beziehung zu den mittels M-T-Test manifestierten Plasma-reaktionen stehen. Die quantitative Aufschlüsselung des umfangreichen Untersuchungsmaterials soll einer besonderen Arbeit vorbehalten bleiben. Zum besseren Verständnis der angeführten Vergleichsdaten schicken wir eine kurze methodische Beschreibung voraus.

Für die P-Mangelzüchtung wurde eine synthetische Nährlösung aus Dextropur, Pepton «Witte» und mineralischen Bestandteilen verwendet. Das Pepton war schwach phosphathaltig, so dass die angesetzte Kultivierungsflüssigkeit 5 mg P im Liter enthielt. Beimpft wurde mit normal in Würze hergeführter Unterhefe Rasse U; die Aussaatmenge betrug 0,2 g Hefe-Trs. je Liter. Die P-Mangelzüchtung erstreckte sich über 3 Passagen von jeweils 7 Tagen. Der Phosphatgehalt der auf diese Weise gewonnenen P-Hungerhefe lag stets unter 5 mg je g Hefe-Trs. Die Regenerierung wurde in 10- bis 11prozentiger Vorderwürze bei einer Einwirkungs-dauer von 2 Stunden vorgenommen (Thermostatentemperatur 20°). Parallel liefen Versuche mit der unter üblichen Bedingungen, das heisst ohne Phosphatmangel gezüchteten Normalhefe. Analytisch bestimmt wurden der Gesamt-P-Gehalt und einzelne P-Frak-tionen (kalter TES-Auszug, Alkohol-Äther-Extrakt, Hydrolyse mit 1-n-KOH, «7-Minuten-P»).

Aus der nachstehenden Tabelle ist zu entnehmen, dass der Gesamt-P-Gehalt der regenerierten P-Hungerhefe weitaus höher liegt als bei der Normalhefe. Die prozentuale Verteilung des Gesamt-P auf die einzelnen Fraktionen (A bis D) ist bei den beiden biologischen

Testobjekten ziemlich gleichlaufend. Scheinbar besteht, wenn man nur die prozentualen Anteile zum Vergleich heranzieht, bei der Differenzierung der Fraktion C (alkalische Hydrolyse) ein Unterschied; denn die «Nuklein-

Vergleich des Gesamt-P-Gehaltes sowie der prozentualen Anteile einzelner P-Frak-tionen von Normalhefe und regenerierter P-Hungerhefe

Regenerierungs- ansatz	
Normalhefe:	2,7 mg Trs./ml = 55,10 ⁶ Zellen Gesamt-P = 14,3 mg je g Hefe-Trs.
P-Hungerhefe:	1,7 mg Trs./ml = 35,10 ⁶ Zellen Gesamt-P = 3,1 mg je g Hefe-Trs.

	Normalhefe	Regenerierte P-Hunger- hefe
mg P je g Hefe-Trs.	20,0	53,9
	% vom	Gesamt-P
A Kalter TES-Extrakt	48,9	46,3
B Alkohol-Äther-Extrakt	2,6	4,9
C Hydrolyse mit 1-n-KOH	42,7	41,5
a) «7-Minuten-P»	17,9	31,4
b) «Nukleinsäure»-P	24,8	10,1
D Rückstand	5,9	3,0

säuren» machen bei der Normalhefe 24,8%, bei der regenerierten P-Hungerhefe nur 10,1% des Gesamt-P-Gehaltes der Hefe-Trs. aus. Berechnet man aber hieraus die absoluten P-Mengen, so ergibt sich für

Normalhefe 4,96 mg «Nukleinsäure»-P
regenerierte P-Hungerhefe 5,44 mg «Nukleinsäure»-P

Dagegen zeigt bereits das «7-Minuten-P» der regenerierten P-Hungerhefe in Prozent des Gesamt-P einen erheblichen Anstieg gegenüber der Normalhefe, welcher noch deutlicher hervortritt, wenn man die auf absoluten P-Gehalt umgerechneten prozentualen Anteile miteinander in Vergleich stellt:

Normalhefe 3,58 mg «7-Minuten-P»
regenerierte P-Hungerhefe 16,92 mg «7-Minuten-P».

Wird die alkalische Hydrolyse, wie sie SCHMIDT und THANNHAUSER¹ angewendet haben, durch die Extraktion mit heisser TES nach WIAME² ersetzt, so resultieren annähernd übereinstimmende Analysenwerte, worüber später noch näher berichtet wird.

F. WINDISCH, St. HINKELMANN
und D. STIERAND

*Institut für Medizin und Biologie, Deutsche Akademie
der Wissenschaften, Berlin, den 28. Dezember 1954.*

Summary

It was established by histochemical method that the regeneration of phosphorus-starved yeast, in comparison with normal yeast, is accompanied by a phosphatic over-compensation. This also provides a striking criterion for the evaluation of the cellular phosphate metabolism.

Inspite of the considerably higher total-P-contents, if regenerated phosphorus-starved yeast, it contains almost the same quantity of "nucleic acids" as normal yeast.

¹ G. SCHMIDT und J. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. 161, 83 (1945).
² J. M. WIAME, J. Biol. Chem. 178, 919 (1949).

On the Concentration of Eosinophile Leucocytes

The eosinophile leucocytes are still very little known as far as their function is concerned. The great increase in their count in parasitic infestation and in allergic conditions has attracted great interest. The concentration and separation of these cells from other cellular elements is, however, a necessary condition for most studies on their cytochemistry and physiology. With this aim in view, some methods have been elaborated¹. These imply rather rough treatments of the cells which must be considered to suffer considerable damage. It was therefore felt important to investigate the possibility of concentrating eosinophile cells with the aid of a counter-streaming centrifuge, constructed by the senior author². This centrifuge, which will soon be described³, is constructed with the aim of separating differently sized particles of the same density. Liquid holding the particles to be separated is forced through a conical centrifuge tube against the centrifugal force. Here the larger particles down to a certain limit are accumulated whereas the smaller ones are carried off to a second tube where they are collected.

Because of the eosinophils being extremely large and the sedimentation rate of the erythrocytes high in the horse, blood of this species was used. As is well known, leucocytes have a tendency to agglutinate. This was counteracted by the use of versene which also served as an anticoagulant.

Blood was drawn from the jugular vein, mixed with isotonic phosphate buffer (pH 7.4) containing versene as to give a final concentration of 0.1% versene. The erythrocytes settled down on standing, and the supernatant, containing the leucocytes, was drawn off, sedimented at 170 g for 3 min and washed several times with Ca⁺⁺-free Tyrode solution, containing 0.05% versene. At this stage, we speak of the material as the "original suspension". The separation in the counter-streaming centrifuge was carried on for 60 min with 300–450 R.P.M. and a streaming velocity of 0.28 ml/sec. The flowing medium in each experiment is given in the Table. The Tyrode solution was Ca⁺⁺-free and contained versene as above. The greatest diameter of the conical tube was 1.60 cm, and the distance between this and the theoretical point of the cone 18.0 cm, the tube being mounted so that this point was 24.0 cm from the centre of rotation⁴. In some experiments the cells were given two runs in the counter-streaming centrifuge.

After this treatment, the state of the material was examined under the microscope at 38°C. The cells appeared morphologically intact and showed normal amoeboid motility. The eosinophile count was determined with the aid of a Fuchs-Rosenthal chamber after staining according to RANDOLPH⁵. In the original suspension, this count varied between 2 and 8% of the total leucocytes.

Eosinophile counts (per cent eosinophils of total leucocytes) in the original suspension and in the conical tube after running in the counter-streaming centrifuge. In

Experiment No. 3 and 4 the same material was given two runs.

Experiment No.	Medium	Original suspension	Fraction in conical tube
1	Isotonic Tyrode	6	21
2	Isotonic Tyrode + saccharose (specific density 1.114)	8	34
3	First run Hypotonic Tyrode (corresponding to 0.85% NaCl)	8	27
	Second run Hypertonic Tyrode (corresponding to 0.95% NaCl)	27	50
4	First run Hypotonic Tyrode (corresponding to 0.85% NaCl)	2	25
	Second run Hypertonic Tyrode (corresponding to 0.95% NaCl)	25	50

As seen from the Table, the separating-out of eosinophils is better the lower the count of the original suspension, the concentrating effect being 3–4 times in the lower, and 2 times in the higher concentration range. By using the counter-streaming centrifuge, samples with eosinophile counts of 20–50% were obtained. On account of individual variations among the horses, it appeared difficult to standardize the procedure.

We are indebted to the Swedish Medical Research Council and to Ely Lilly and Company for financial support.

P. E. LINDAHL and K. M. LINDAHL

Institute of Zoophysiology, Uppsala (Sweden), May 15, 1955.

Zusammenfassung

Eine Methode zur Anreicherung lebender eosinophiler Leukocyten des Pferdes mit Hilfe einer Gegenstrom-zentrifuge wird ausgearbeitet. In den angereicherten Suspensionen wurde eine Konzentration von 20 bis 50% erreicht.

The Effect of Protamine on the Action of ACTH

The problem of ACTH-heparin antagonism has been extensively dealt with in recent literature, since a number of authors attributed a physiological role to heparin in the inactivation of ACTH¹. We have been unable to confirm this view since it was found that not even pharmacological doses of heparin had any influence on the adrenal ascorbic acid depleting effect of ACTH².

In view of the antagonism existing between heparin and protamine in the mechanism of blood clotting, we have examined protamine for possible effects thought to be specific for ACTH, starting from the assumption that although exogenous heparin cannot enhance the action of physiological heparin, it may be possible that, by neutralising heparin circulating under normal conditions, the effects of ACTH are increased.

¹ Z. Z. GODLOWSKY, Brit. Med. J. 1951, Bd. 4711, 854. – L. WEISSBECKER and A. SCHRÖTER, Klin. Wschr. 31, 288 (1953). – F. KOLLER and W. FRITSCHY, Helv. med. Acta 14, 263 (1953).

² Gy. FEKETE, Acta med. Acad. Sci. Hung. (in press).

¹ R. VERCAUTEREN and G. PEETERS, Arch. Int. Pharm. 89, 10 (1952). – M. BEHRENS und H. R. MARTI, Exper. 10, 315 (1954). – K. M. LINDAHL, 6, 569 (1954).

² P. E. LINDAHL, Nature 161, 648 (1948).

³ I.V.A.'s Tidskrift för Tekniskt-vetenskaplig Forskning (Stockholm).

⁴ P. E. LINDAHL, Nature 161, 648 (1948).

⁵ T. G. RANDOLPH, Proc. Soc. Exper. Biol. et Med. 52, 20 (1943).

Methods

(1) Adrenal ascorbic acid depletion was estimated by the method of GYERMEK¹. Essentially this method consists of a comparison of the ascorbic acid contents of the right and left adrenals, following the intravenous administration of ACTH in the decapitated rat. Protamine sulphate was administered immediately prior to ACTH, also by the intravenous route.

(2) The thymus involution test was carried out by the method of BRUCE *et al.*² as modified by FEKETE and GYERMEK³. The test substances were given in a ratio of 1:3, on one occasion, using Zn₃(PO₄)₂ as a vehicle. At 48 h after treatment, the animals were sacrificed and examined for thymus involution, comparing the glands with those of the controls. Protamine sulphate and albumin, respectively, were added to the precipitate formed and the subcutaneous route of administration was used.

(3) Melanophore expanding activity was studied in the frog by GYERMEK's method⁴. The frog was given adrenalin (to induce decolorisation of the skin) ACTH and protamine sulphate simultaneously into the abdominal lymph sac.

Results

The results of the experiments are tabulated.

According to the data in Table I, 2,0 mg/100 g protamine inhibited almost completely the adrenal ascorbic acid depleting effect of 0,5 milliunits/100 g ACTH. When given alone, this dose of ACTH caused a depletion of 66.4 ± 5.8 mg %, while after protamine the depletion was only 14.1 ± 8.3 mg %, the difference being significant (P < 0.01).

Table I

No.	No. of rats	ACTH dose	Protamine dose	Ascorbic acid depletion
1	18	0.5 µg/100 g	1.5 mg/100 g	14.1 ± 8.3 mg%*
2	30	0.5 µg/100 g	—	66.4 ± 5.8 mg%*

* S.E.

Table II shows that 0.6 Units of ACTH in Zinc phosphate caused a considerable involution of the thymus gland, and even a dose of 0.2 Units/animal produced a more marked atrophy than a larger dose of ACTH in case 1 mg/animal protamine sulphate was added to the precipitate. It might be claimed that the cause of this phenomenon lies in the fact that protamine sulphate exhausts a considerable proportion of the adsorptive capacity of the precipitate at the expense of ACTH. This, however, is not the case, since the addition of the same amount of albumin to the precipitate increases rather than decreases the effect of ACTH under this condition, presumably by virtue of a protective protein action.

On the other hand, protamine was found to be ineffective on the melanophore expanding activity in the

frog, since ACTH combined with protamine sulphate had the same effect as ACTH alone.

Table II

No.	No. of rats	Treatment	Thym. involution	P
1	9	600 µg ACTH	53%	1-2 < 0.01
2	11	600 µg ACTH + 1 mg Protam.	15%	
3	9	200 µg ACTH	22%	3-4 < 0.02
4	11	200 µg ACTH + 0.3 mg Protamine	—	
5	9	600 µg ACTH + 1 mg Alb.	58%	1-5 > 0.05 2-5 < 0.01

For the explanation of the phenomenon described, two hypotheses have arisen. First it was suggested that the two basic proteins would compete for the receptors in the adrenal cortex and protamine, being present in greater concentration, would gain ground at the expense of ACTH, while in the chromatophore effect, in which the adrenal cortex is not involved, this competition is absent. However, paper chromatographic studies¹, have revealed that protamine sulphate adsorbed ACTH and the presumably resulting complex possessed no more ACTH activity. The recent report by KREBS² and MADSEN³ that phosphorylase is inhibited by protamine in a similar way, lends substantial support to the validity of this explanation. This explains also the negative effects in the chromatophore test which is thought to be further evidence indicating that ACTH and chromatophore effects are bound to the presence of two different pituitary factors, as it was emphasized in the recent convincing work by LERNER and SHIZUME⁴.

The ACTH-protamine complex is being studied by paper electrophoresis and chromatography and investigations are in progress to elucidate the possible role played by basic proteins in the physiological inactivation of ACTH. The results of this work will be published elsewhere.

GY. FEKETE⁵

Department of Pharmacology, Pharmaco-Industrial Research Institute, Budapest, March 31, 1955.

Zusammenfassung

Bei Ratten verursachen 0,5 µg ACTH/100 g keine Verminderung des Ascorbinsäuregehaltes der Nebenniere, wenn gleichzeitig 20 mg/kg Protaminsulfat gegeben werden.

Ebenfalls bei Ratten vermag ACTH bei gleichzeitiger Verabreichung mit Protaminsulfat keine Thymusatrophie hervorzurufen. Die Beeinflussung der Chromatophoren-Aktivität durch dasselbe ACTH-Präparat bei *Rana esculenta* wird dagegen durch Protaminsulfat nicht geändert.

¹ L. GYERMEK, Exper. 8, 438 (1952).

² H. M. BRUCE, A. S. PARKES and W. L. M. PERRY, Lancet Apr. 19, 790 (1952).

³ Gy. FEKETE and L. GYERMEK, Acta Pharmaceutica 25, 74 (1955).

⁴ L. GYERMEK, Orvosi Hetilap (Hung.) 4, 122 (1954).

⁵ Present address: Dept. of Pharmacology, Chemical Works of G. Richter Ltd., Budapest X.

¹ Gy. FEKETE and A. HEGYELI, unpublished results.

² E. G. KREBS, Biochim. et Biophys. Acta 15, 508 (1954).

³ N. B. MADSEN and C. F. CORI, Biochim. et Biophys. Acta 15, 516 (1954).

⁴ A. B. LERNER, K. SHIZUME, and I. BUNDING, J. Clin. Endocrin. 14, 1463 (1954).

Die Wirkung von D-Lysergsäure-diäthylamid (LSD 25) und 5-Oxytryptamin auf die Chromatophoren von *Poecilia reticulatus*

Das von STOLL und HOFMANN¹ hergestellte D-Lysergsäure-diäthylamid (LSD 25 oder Delysid) hat durch seine ausgeprägte vegetative und psychische Wirksamkeit beim Menschen vor allem in der Psychiatrie Bedeutung erlangt². Obwohl LSD 25 auch im Tierexperiment interessante Effekte entfaltet, ist es nicht leicht, die spezifische Wirkungsweise dieses Stoffes an Hand pharmakologischer Tests zu erfassen. Daran hat auch die erst in neuerer Zeit hinzugekommene Erkenntnis, dass LSD 25 ein hochaktiver Antagonist des 5-Oxytryptamin (Serotonin, Enteramin) ist³, nichts geändert. Denn Körper, welche dem LSD 25 chemisch sehr nahe stehen und dasselbe als Serotoninhemmer zum Teil übertreffen, besitzen keine LSD-artige Wirkung am Menschen (Literatur bei CERLETTI und ROTHLIN⁴).

Auf der Suche nach einfachen LSD-Testen haben wir schon vor einigen Jahren u.a. auch präliminäre Versuche an Weibchen des verbreiteten Zierfisches Guppy (*Poeci-*

lia reticulatus) durchgeführt und dabei eine charakteristische Wirkung des LSD 25 auf die Chromatophoren festgestellt. Wir haben diese Wirkung seither näher zu präzisieren versucht und können unsere bisherigen Befunde folgendermassen zusammenfassen: Die Tiere werden für den Versuch einzeln in Küvetten mit 30 ml Brunnenwasser (Zimmertemperatur) gebracht und an helle Umgebung adaptiert. Werden dem Wasser 1–2 µg/ml oder mehr LSD 25 zugefügt, so entwickelt sich eine deutliche Dunkelfärbung der normalerweise glasig-grauen Tiere. Die Grundfarbe wird gelblichgrau und später grauschwarz; die den Schuppengrenzen entsprechende Zeichnung verstärkt und verbreitet sich. In den Flossen wird die Pigmentation in Form von Körnchen besonders gut sichtbar. Bei höheren Konzentrationen von LSD 25 setzt dieser Effekt bereits nach einigen Minuten ein, während bei stärkeren Verdünnungen die Wirkung in der Regel erst nach 60–120 min voll entwickelt ist.

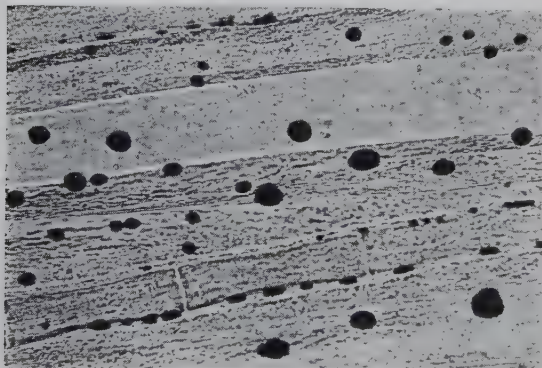
Zur mikroskopischen Untersuchung eignen sich besonders die in Bouinscher Lösung fixierten Rückenflossen von über 25 mm langen Tieren. Es zeigt sich hierbei, dass bereits Dosen unterhalb 1 µg/ml eine gewisse Wirkung ausüben können. Die Chromatophoren des helladaptierten Tieres erscheinen als kompakte, dunkle «Scheiben» mit ziemlich scharfer Kontur (Abb. 1A). Gerade noch wirksame Konzentrationen von LSD 25 lockern diese Gebilde auf: es entstehen «Klumpen»- und «Stechapfel»-Formen (Abb. 1B). Nach grösseren Mengen von LSD 25 breitet sich das Pigment weiter aus: die Chromatophoren zeigen lange Fortsätze («Spinnen», Abb. 1C). Noch höhere Konzentrationen bewirken weitere Auflockerung und feinere Verteilung des Pigmentes

¹ A. STOLL und A. HOFMANN, *Helv. chim. Acta* 26, 944 (1943).

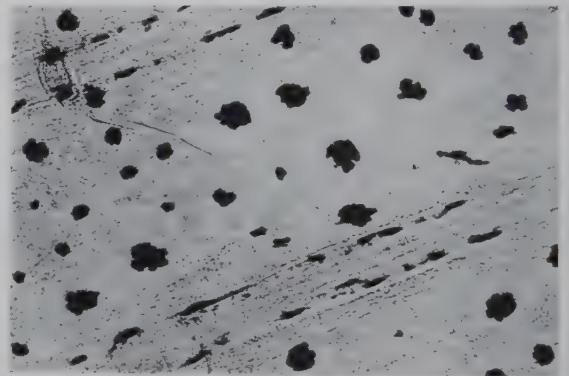
² A. M. BECKER, *Wien. Z. Nervenhk.* 2, 402 (1949). – G. R. FORRER und D. R. GOLDNER, *Arch. Neurol. (Amer.)* 65, 581 (1951). – W. FREDERICK, *Psyche* 7, 342 (1953/54). – R. A. SANDISON, A. M. SPENCER und J. D. A. WHITELAW, *J. Ment. Sci.* 100, 491 (1954). – W. A. STOLL, *Schweiz. Arch. Neurol.* 60, 279 (1947).

³ J. H. GADDUM und K. A. HAMEED, *Brit. J. Pharmacol.* 9, 240 (1954). – K. H. GINZEL und S. R. KOTTEGODA, *Quart. J. Exper. Physiol.* 38, 225 (1953).

⁴ A. CERLETTI und E. ROTHLIN (im Druck).



A



B



C



D

Abb. 1. Rückenflossen von *Poecilia reticulatus* ♀, fixiert in Bouinscher Lösung, 270fache Vergrösserung. A helladaptiertes Kontrolltier («Scheiben»); B 0,4 µg/ml LSD 25 («Klumpen» und «Stechapfel»); C 1,6 µg/ml LSD 25 («Spinnen»); D 25,6 µg/ml LSD 25 («aufgelockerte Spinnen»). Versuchsdauer 120 min.

(«aufgelockerte Spinnen», Abb. 1D). Auch die Chromatophoren der Haut verändern sich charakteristisch.

Das regelmässige Auftreten der oben beschriebenen Veränderungen der Chromatophoren in der Rückenflosse bei steigenden Konzentrationen von LSD 25 erlaubt einen quantitativen Vergleich der diesbezüglichen Wirkung chemisch verwandter Substanzen. Setzt man die Aktivität von D-Lysergsäure-diäthylamidtartrat willkürlich gleich 100, so beträgt diejenige seines linksdrehenden Isomers (L-Lysergsäure-diäthylamidtartrat) etwa 3, die von D-1-Brom-lysergsäure-diäthylamidbitartrat rund 250 und die von Methyl-ergobasintartrat (Methergin) etwa 0,8.

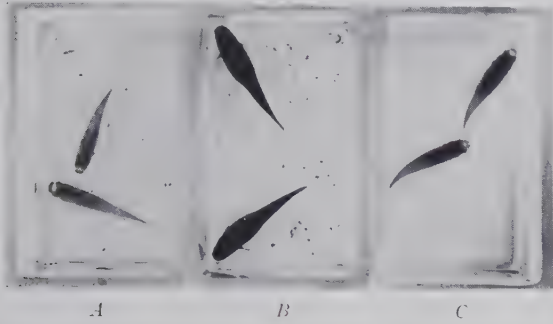


Abb. 2. *Poecilia reticulatus* ♀. A helladaptierte Kontrolltiere; B 25 µg/ml LSD 25 während 120 min; C 1000 µg/ml 5-Oxytryptamin 120 min lang, dann zusätzlich 25 µg/ml LSD 25 120 min lang.

5-Oxytryptamin-kreatininsulfat, in grossen Dosen prophylaktisch verabreicht, verhindert die Wirkung von LSD 25 auf die Chromatophoren (Abb. 2). Die hierzu nötigen Konzentrationen von 5-Oxytryptamin sind zwar gross (zum Beispiel 500 µg/ml oder 1000 µg/ml), haben aber auf die Farbe der Fische auch bei längerer Einwirkung in der Regel keinen Einfluss. Nur gelegentlich zeigen einige Tiere leichte Dunkelfärbung. Während die Hemmung von 5-Oxytryptamin-Effekten durch LSD 25 in zahlreichen verschiedenen Testen nachgewiesen werden kann, ist der umgekehrte Antagonismus von Serotonin gegenüber LSD 25 wohl schon erwähnt, aber bisher noch nicht so eindeutig demonstriert worden, wie das an Hand der Chromatophorenreaktion gelungen ist.

A. CERLETTI und B. BERDE

Pharmakologisches Laboratorium der Sandoz AG, Basel, den 14. Mai 1955.

Summary

D-lysergic acid diethylamide (LSD 25) has a characteristic effect on the chromatophores of the female fish guppy (*Poecilia reticulatus*). This effect can be prevented by prophylactic administration of 5-hydroxytryptamine (serotonin, enteramine).

Quantitative Untersuchungen über den Nukleinsäureverlust des Gewebes bei Fixierung und Einbettung¹

Die histochemische Untersuchung von Geweben erfordert in den meisten Fällen eine Vorbehandlung (Fixierung, Einbettung), über deren Auswirkung auf die Struktur und die chemische Zusammensetzung der Zellsubstanzen wir bisher nur mangelhaft unterrichtet sind. Für den quantitativen Nachweis bestimmter Zellbestandteile muss neben vielen anderen Voraussetzungen

gefordert werden, dass die Vorbehandlung des Gewebes keinen Verlust der nachzuweisenden Substanz zur Folge hat.

Zur quantitativen histochemischen Erfassung der Nukleinsäuren stehen uns einmal färbereiche Reaktionen zur Verfügung (Feulgenreaktion für Desoxyribonukleinsäure, Gallozyaninchromalaun für Desoxy- und Ribonukleinsäure SANDRITTER¹, DIEFENBACH²), zum anderen die lichtoptische Methode von CASPERSSON³. Neben einem Verlust von Nukleinsäuren muss bei beiden Methoden mit anderen Veränderungen (Maskierung reaktiver Gruppen, unspezifische Absorption und anderes) gerechnet werden. Mehrere Autoren (SYLVEN⁴, HARBERS und NEUMANN⁵, SIBATANI und FUKUDA⁶ und andere) haben sich in jüngster Zeit mit dieser Frage beschäftigt und kamen zu widersprechenden Ergebnissen. Unsere eigenen quantitativen ultraviolett-mikro-spektrographischen Untersuchungen⁷ veranlassten uns, der Frage nach einem möglichen Nukleinsäureverlust durch die Fixation, Einbettung und Nachbehandlung des Gewebes nachzugehen.

Methodik. Die Untersuchungen wurden an der Leber von Kaninchen durchgeführt. Zur quantitativen chemischen Bestimmung der Nukleinsäuren verwendeten wir mehrere Methoden gleichzeitig nebeneinander. Der Gehalt an Desoxyribonukleinsäurephosphor (DNSP.) und Ribonukleinsäurephosphor (RNSP.) wurde nach SCHMIDT und TANNHAUSER und OGUR und ROSEN bestimmt, ausserdem wurden die Perchlorsäureextrakte des Gewebes bei 260 mµ Wellenlänge im Beckmann-Photometer gemessen. Alle Methoden ergaben eine gute Übereinstimmung, obwohl bei der Schmidt-Tannhauser-Methode die Variationsbreite der Ergebnisse grösser war als bei der Methode nach OGUR und ROSEN. Als Ausgangswerte dienten die Ergebnisse der Nukleinsäurebestimmungen des Frischgewebes (2 cm³ Material). Das Gewebe wurde in Formalin (Verdünnung 1:10) fixiert (24 h Zimmertemperatur) oder in Carnoy'scher Lösung (2 h Zimmertemperatur). Ein Teil des fixierten Gewebes wurde unter den üblichen Bedingungen (70, 96 % Alkohol, Azeton, Xylol) in Paraffin eingebettet, *in toto* entparaffiniert (Xylol, 96, 70 % Alkohol, Aqua dest.) und zur Bestimmung der Nukleinsäuren homogenisiert. Der andere Teil des Gewebes wurde ohne Einbettung unmittelbar nach der Fixation verarbeitet. Zur Kontrolle wurden die Fixierungsmittel und die zur Nachbehandlung angewandten Flüssigkeiten konzentriert und papierchromatographisch auf ihren Nukleinsäure- und Eisweisskörpergehalt untersucht (Kontaktphotographie im UV.-Licht, Ninhydrin-Amidoschwarz- und Gallozyaninchromalaunfärbung). Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und die Signifikanz durch Fehlerrechnung gesichert.

Ergebnisse. Die Tabelle zeigt den Nukleinsäure-Phosphorgehalt verschieden vorbehandelten Gewebes in mg P und den Nukleinsäuregehalt nach Umrechnung aus den Extinktionswerten bei 260 mµ Wellenlänge.

¹ W. SANDRITTER, M., DIEFENBACH und F. KRANTZ, *Exper.* 10, 210, (1954).

² H. DIEFENBACH und W. SANDRITTER, *Acta Histochem.* 1, 55 (1954).

³ T. O. CASPERSSON, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton, New York 1951).

⁴ B. SYLVEN, *Extrait de Acta Union Internationale contre le Cancer* 7, 700 (1951); *Freezing and Drying* (published by the Institute of Biology London 1951, S. 169).

⁵ E. HARBERS und K. NEUMANN, *Z. Naturforschg.* (im Druck).

⁶ A. SIBATANI und M. FUKUDA, *Biochim. Biophys. Acta* 10, 93 (1953).

⁷ W. SANDRITTER, *Frankfurter Z. Path.* 64, 520 (1953).

¹ Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Art der Vorbehandlung	A = Analysenwert B = % des Frischgewebes	Zahl	mg P in 2 cm ³ Gewebe				mg NS in 2 cm ³ Gewebe (UV.)			
			DNS.	σ	RNS.	σ	DNS.	σ	RNS.	σ
1. Frischgewebe . . .	A B	10	0,373 100	0,0097	0,697 100	0,006	3,7 100	0,21	17,9 100	0,96
2. Formalinfixation .	A B	10	0,374 100,2	0,013	0,675 96,8	0,008	4,3 116,2	0,30	15,8 88,2	1,02
3. Carnoy-Fixation .	A B	10	0,315 84,4	0,0136	0,695 99,6	0,003	4,5 121,6	0,32	17,4 97,2	0,20
4. Frischgewebe . . .	A B	10	0,613 100	0,004	1,10 100	0,02	5,2 100	0,3	21,2 100	0,97
5. Formalinfixation, Paraffineinbettung	A B	10	0,607 99,0	0,007	1,09 99,9	0,01	5,1 98,0	0,14	22,0 103,7	1,32
6. Carnoy-Fixation, Paraffineinbettung	A B	10	0,620 101,1	0,008	1,14 103,6	0,03	4,4 84,6	0,26	25,0 117,9	1,79

Hierbei wurde als Eichkurve eine 9,3% Phosphor enthaltende DNS.-Lösung verwendet mit einer Extinktion von 0,905 (0,005%ige Lösung). Die Tabelle zeigt, dass die Vorbehandlung des Gewebes (Fixierung, Einbettung und Nachbehandlung) nicht zu einem messbaren Nukleinsäureverlust führt. Die Ergebnisse sind statistisch gesichert. Die höheren Nukleinsäure-Phosphor-Werte unter Nr. 4-6 der Tabelle sind damit zu erklären, dass in diesen Versuchen die Leber eines jüngeren Tieres verwendet wurde. Ausschlaggebend ist hier die Übereinstimmung der Werte des Frischgewebes mit dem vorbehandelten Gewebe.

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Fixierungsmittel und der bei der Einbettung und Nachbehandlung angewandten Flüssigkeiten zeigen, dass keine Nukleinsäure in Lösung gegangen ist (Färbung mit Gallozyaninchromalaun). Dagegen konnten in den Fixierungsflüssigkeiten (Carnoy und Formalin) und in dem bei der Einbettung benutzten 70%igen Alkohol Spuren von Eiweiss und Aminosäuren (Polypeptide) nachgewiesen werden (Kontaktphotographie, Färbung mit Amidoschwarz und Ninhydrin).

Diskussion. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern fanden wir bei der Vorbehandlung von Lebergewebe keinen Verlust an Nukleinsäure. SYLVEN berichtet über einen beträchtlichen Masseverlust des Gewebes nach Fixierung mit Formalin, Carnoy und absolutem Alkohol (24 h Zimmertemperatur), der auf eine Lösung von Fetten, Eiweisskörpern und Nukleinsäuren zurückzuführen sei. Auch HARBERS und NEUMANN finden bei Carnoy-Fixation bei Zimmertemperatur einen zunehmend stärkeren RNS.-Verlust des Gewebes bis zu 60% (in Abhängigkeit von der Fixationsdauer), während bei der Fixation in der Kälte (4°) keine Nukleinsäure in Lösung geht. Diese Untersuchungen zeigen, dass bei saurehaltigen Fixationsmitteln bei längerer Einwirkung und höherer Temperatur RNS. leicht in Lösung geht. Dieser Befund wird verständlich, wenn man bedenkt, dass mit verschiedenen Säuren (HClO₄, HCl und anderen) und schon mit heissem Wasser die RNS. leicht hydrolysiert werden kann und diese Substanzen teilweise als Ersatz für die Ribonuklease angewendet werden. Die DNS. scheint dagegen wesentlich stabiler zu sein.

Bei der Fixation mit Formalin (50%ig, 20%igem Formalin und Alkoholformalin 9:1) fanden SIBATANI und FUKUDA übereinstimmend mit unseren Untersuchungen keinen Nukleinsäureverlust des Gewebes.

Auch MOBERGER¹ beobachtete keinen messbaren Verlust des Trockengewichtes (Röntgenabsorption) beim Vergleich von formalinfixiertem und gefriergetrocknetem Material. KAUFMANN² *et al.* sehen eine geringe Lösung von Proteinen nach Carnoy-Fixation. Bei der Fixation mit Formalin und Carnoyscher Flüssigkeit hat man demnach mit einem geringen Proteinverlust des Gewebes zu rechnen. Man muss aber hierbei in Rechnung setzen, dass diese geringen Proteinmengen auch aus dem Blutplasma oder den Erythrozyten stammen können.

Weitere Untersuchungen an gefriergetrocknetem Material sind im Gange.

W. SANDRITTER und J. HARTLEIB

Senckenbergisches Pathologisches Institut der Universität Frankfurt am Main, den 14. April 1955.

Summary

Quantitative chemical determination of nucleic acid shows that no loss of nucleic acid occurs on fixation with formalin and CARNOY's solution (24 or 2 h at room temperature) and after dehydration and embedding of the tissues. Small amounts of protein were shown in the fixative solution.

¹ G. MOBERGER, Acta Radiol. Suppl. Stockholm 1954, 112.

² B. P. KAUFMANN, M. R. McDONALD, H. GAY, K. WILSON, R. WYMAN und N. OKUDA, Carnegie Year Book 47, 144 (1948).

Über

6-(4'-Pyridyl)-3-mercapto-1,2,4-triazin-5-on

In einer früheren Mitteilung wurde über die Eigenschaften einer Reihe von substituierten Mercapto-triazinonen berichtet¹. Bei der Weiterbearbeitung dieses Gebietes zeigte sich, dass das dort beschriebene 6-(4'-Pyridyl)-3-mercapto-1,2,4-triazin-5-on nicht einheitlich war, indem bei der Herstellung durch Zersetzung teilweise ein Nebenprodukt entsteht.

¹ R. E. HAGENBACH, E. HODEL und H. GYSIN, Angew. Chemie 66, 359 (1954); vgl. Exper. 10, 62 (1954).

Wird das Oxim des 4-Pyridyl-glyoxylsäureesters mit verdünnter Mineralsäure in Gegenwart von Thiosemicarbazid gespalten, so decarboxyliert die Säure teilweise, und es entsteht neben dem Pyridyl-mercapto-triazinon auch Isonicotinaldehyd-thiosemicarbazon, ein schon bekanntes Tuberkulostatikum, das sich als Hauptträger der Wirksamkeit erwies¹. Unter gleichen Versuchsbedingungen wird ein ungefähr konstantes Gemisch der beiden Substanzen erhalten, aus dem sich mit schwachen Basen das Mercapto-triazinon infolge der Schwerlöslichkeit seiner Salze nur schwierig abtrennen lässt. Das reine Pyridyl-mercapto-triazinon schmilzt, aus wässrigem Pyridin umkristallisiert, bei 308° unter Zersetzung (Koflerblock).

Bei keinem der anderen von uns beschriebenen Mercapto-triazinone konnte eine derartige Decarboxylierung beobachtet werden.

R. E. HAGENBACH und H. GYSIN

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy AG.,
Basel, den 31. Mai 1955.

Summary

In synthesizing 6-(4'-pyridyl)-3-mercapto-1,2,4-triazin-5-one from the oxime of 4-pyridyl-glyoxylic acid, isonicotinaldehyde-thiosemicarbazone is obtained through decarboxylation as a by-product, which is mainly responsible for the tuberculostatic properties.

¹ Vgl. J. HIRSCH, *Naturwissenschaften* 41, 142 (1954).

Colorimetric and Spectrophotometric Titration of 5-Hydroxyindoleacetic Acid

5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) has been shown to be a normal constituent of the urine of omnivorous and carnivorous mammals and probably of other Vertebrates¹.

Although it cannot be excluded that 5-HIAA comes from 5-hydroxytryptophan without passing through 5-hydroxytryptamine(5-HT)², it seems probable that the main part of the urinary 5-HIAA derives from the oxidative deamination of 5-HT.

The quantitative estimation of the urinary output of 5-HIAA has been suggested as the method of preference for a comprehensive evaluation of the general metabolism of 5-HT in the organism. Of course, we cannot expect to get by this method any reliable information on the turnover of 5-HT in the central nervous system, since brain 5-HT makes up hardly 1% of the total 5-HT in the mammalian organism³.

The two following procedures may be employed in the quantitative titration of 5-HIAA in pure solutions or in watery eluates of 5-HIAA spots from paper chromatograms.

¹ V. ERSAMER, *J. Physiol.* 127, 118 (1955); *Pharmacol. Rev.* 6, 425 (1954). – E. TITUS and S. UDENFRIEND, *Federation Proc.* 13, 411 (1954).

² S. UDENFRIEND, Personal communication to V. ERSAMER (1955).

³ V. ERSAMER, *Medicina*, Parma (in the Press). – P. CORREALE, forthcoming publication.

p-Dimethylaminobenzaldehyde reaction. To 2 volumes of the liquid under investigation 1 volume of a freshly prepared 2% solution of *p*-dimethylaminobenzaldehyde in concentrated HCl is added. The tubes are then placed in a water bath at 56–58° for 10–12 h.

The coloured solutions are read, within 3 h, in a Beckman spectrophotometer at 600 m μ . LAMBERT and BEER's law is valid between 2 and 25 μ g 5-HIAA per milliliter liquid (Fig. 1).

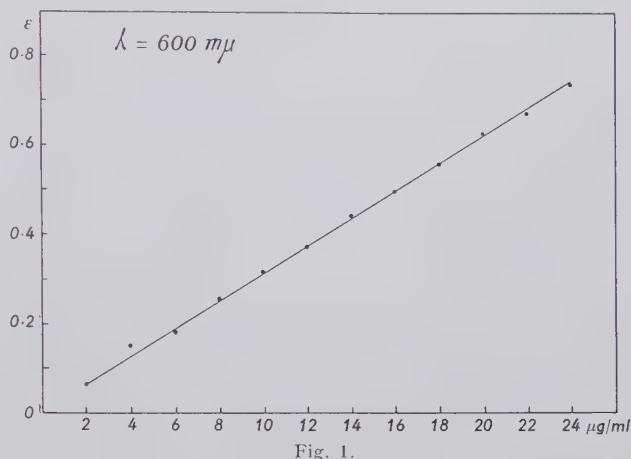


Fig. 1.

Ultraviolet absorption spectrum. Aqueous solutions of 5-HIAA, adjusted to pH 7, show in ultraviolet a maximum of absorption at 221 m μ . LAMBERT and BEER's law is valid between 1 and 15 μ g 5-HIAA per milliliter (Fig. 2).

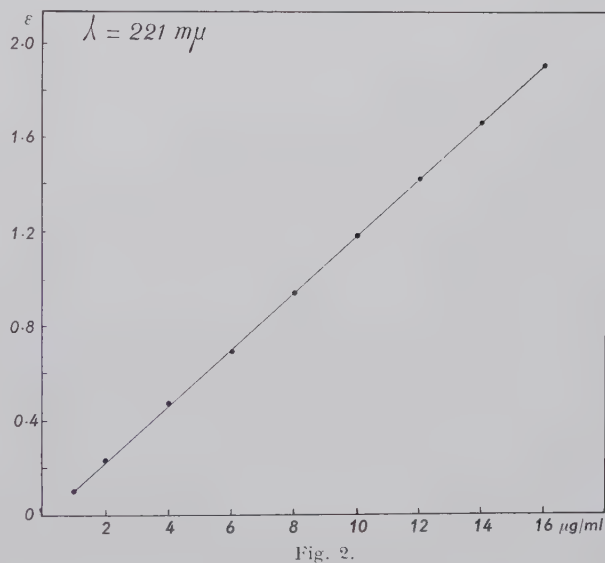


Fig. 2.

Neither of the above methods can be applied directly to biological liquids or crude extracts of biological materials, owing to the presence of disturbing substances. On eluates of urine chromatograms we have succeeded so far in obtaining satisfactory results only with the first method, and only in the case of intense and pure 5-HIAA spots.

P. CORREALE

Pharmacological Institute, University of Bari, Italy,
April 25, 1955.

Riassunto

Vengono descritti due metodi, colorimetrico l'uno e spettrofotometrico l'altro, atti alla titolazione quantitativa dell'acido 5-idrossiindolilacetico in soluzioni pure o in eluati, da cromatogrammi su carta, di macchie costituite da acido 5-idrossiindolilacetico.

On the Formation of Coprosterol in the Intestine

Considerable confusion exists in the literature concerning the formation of coprosterol from cholesterol in the intestine.

This is primarily due to three causes:

(1) Failure of attempts to reproduce the process *in vitro* by bacteria (DAM¹).

(2) The belief that cerebroside is necessary for the process to occur (ROSENHEIM and WEBSTER²).

(3) The belief that cholestenone plays a decisive role as an intermediate (cf. ROSENHEIM and WEBSTER²).

The problem has, however, been largely clarified.

In our laboratory it has recently been shown that certain anaerobic bacteria from human feces are able to hydrogenate cholesterol in the form of a colloidal brain suspension to a very high degree (80 to 90%), *in vitro*, whereas several other such bacteria were unable to carry out the hydrogenation under the conditions of our experiments. No hydrogenation occurred with several strains of *Escherichia coli*, several clostridia and bacteroides. A germfree filtrate from human feces was also inactive. The details of this work will be published elsewhere.

Even though our substrate—a brain suspension—contained cerebroside we do not believe that these substances are essential for the observed hydrogenation of cholesterol.

One of us (DAM³) has already shown that, in man, ingested cholesterol was hydrogenated to an extent of more than 80% with diets free from cerebroside, and ROSENFELD *et al.*⁴ have carried out, with feces, the hydrogenation of a colloidal suspension of cholesterol not containing cerebroside.

The last mentioned authors have shown, by isotope studies, that cholestenone is not a necessary intermediate in the hydrogenation process. It must, therefore, be concluded that the intestinal formation of coprosterol from cholesterol occurs by direct bacterial hydrogenation.

The identification of single strains of bacteria, capable of carrying out the process, is now under investigation.

AGNETE SNOG-KJAER,
INGE PRANGE, and H. DAM

Department of Biochemistry and Nutrition, Polytechnic Institute, Copenhagen, May 17, 1955.

Zusammenfassung

Es wurde die Umwandlung von Cholesterin zu Coprosterin *in vitro* durch gewisse anaerobe Bakterien aus Kot durchgeführt.

¹ H. DAM, Biochem. J. 28, 820 (1934).

² O. ROSENHEIM and T. A. WEBSTER, Biochem. J. 35, 920 (1941).

³ H. DAM, Biochem. J. 28, 815 (1934).

⁴ R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, L. HELLMAN, and T. F. GALLAGHER, Federation Proc. 13, 284 (1954). — R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, L. HELLMAN, and T. F. GALLAGHER, J. Biol. Chem. 211, 301 (1954).

Stämme von *Escherichia coli*, *Clostridia* und *Bacteroides* erwiesen sich als unwirksam. Die Versuche über die Identifikation der wirksamen Bakterien werden fortgesetzt.

Dosage de la procaïnesterase sérique par spectrophotométrie différentielle

R. HAZARD a montré dans une série de travaux l'intérêt que présente le dosage de la procaïnesterase sérique¹. La méthode de dosage proposée jadis repose sur la diazotation de l'acide paraminobenzoïque (apab.) libéré au cours de la réaction. Cette méthode, quoique facile à exécuter, est peu apte à des études de nature cinétique. De telles études furent néanmoins commencées² et la figure 1 montre la marche de l'hydrolyse d'après les données de HAZARD et RAVASSE (100 γ de procaïne pour 1 ml de sérum).

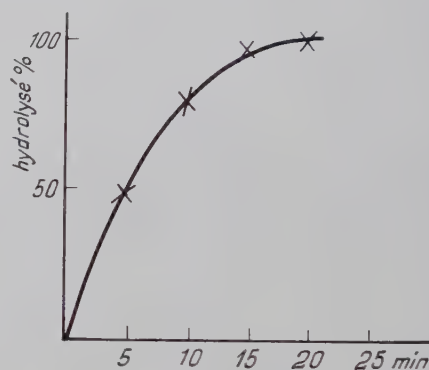


Fig. 1.

Les autres méthodes habituelles de dosage des estérases, comme la méthode manométrique d'AMMON³ et la méthode titrimétrique ne sont pas applicables⁴ à la procaïnesterase, car le pH du milieu augmente au début de l'hydrolyse. Notamment l'acide pab. est un acide faible, tandis que le diéthylaminoéthanol est une base relativement forte. La figure 2 donne les résultats d'une expérience, où le pH du milieu fut enregistré pendant 24 h à 37° (avec un pH-mètre «Radiometer», type 22, muni d'un enregistreur, électrode de verre-pont, agar-électrode de calomel saturée). Le mélange de réaction comportait 1 ml du sérum humain normal, 1 ml d'une

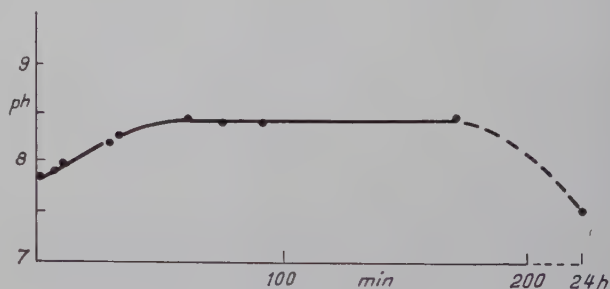


Fig. 2.

¹ R. HAZARD, Presse méd. 56, 529 (1948). — R. HAZARD, P. NICAUD et A. LAFITTE, Presse méd. 57, 113 (1949). — R. HAZARD, C. BONAMY et A. CORNEC, Presse méd. 57, 1133 (1949).

² R. HAZARD et J. RAVASSE, C. r. Soc. Biol. 139, 13 (1945).

³ R. AMMON, Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1933).

⁴ L. ROBERT, B. ROBERT et M. ROBERT, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 1859 (1951).

solution de procaine à 0,02 M et 8 ml d'eau distillée. Dans 1 h le pH monte de 7,85 à 8,45, et descend après un palier long à 7,5 en 24 h. Le pH d'une même quantité de sérum dans le même volume final descend de 8 à 6,35 en ajoutant 1 ml d'une solution d'acide pab. 0,02 M.

La figure 3 montre le spectre d'absorption UV de la procaine et de l'apab. (1 ml d'une solution aqueuse de 0,02 M, 1 ml de phosphate disodique 0,1 M, 1 ml d'eau distillée). Le tableau I donne les valeurs pour la variation du coefficient d'absorption molaire à différentes longueurs d'onde. On a admis pour ces calculs que la base libérée au cours de l'hydrolyse n'influe pas sur la variation de la densité optique.

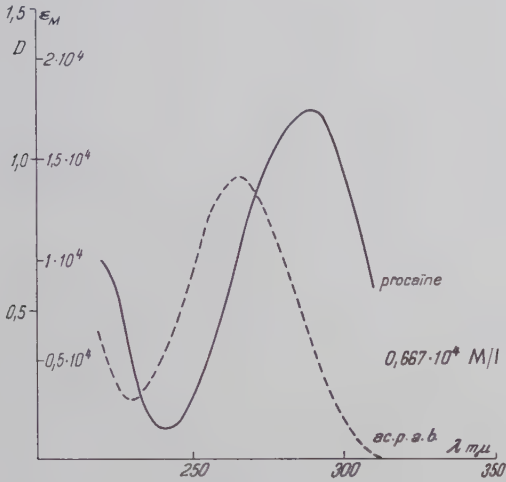


Fig. 3.

L'inspection de la figure 3 montre que la densité optique du milieu doit fortement baisser au cours de l'hydrolyse de la procaine, si l'on se place entre 290 et 310 mμ. Pour les dosages nous avons choisi la longueur

Tableau I. Variation du coefficient d'absorption molaire au cours de l'hydrolyse de la procaine

Longueur d'onde mμ	$\Delta \epsilon_M$
310	$0,82 \cdot 10^4$
300	$1,22 \cdot 10^4$
295	$1,28 \cdot 10^4$
290	$1,20 \cdot 10^4$
280	$0,64 \cdot 10^4$

d'onde de 295 mμ. Le tableau II donne les résultats d'une expérience effectuée sur un mélange de 1 ml d'un sérum humain, 1 ml d'une solution de procaine à 0,02 M ainsi que sur 3 mélanges témoins contenant le sérum seul, la procaine seule et le sérum (1 ml) avec 1 ml d'une solution d'acide pab. 0,02 M.

Tableau II. Variation de la densité optique au cours de l'hydrolyse de la procaine par le sérum à 37°

Composition du mélange	Densité optique après		
	0 min	60 min	24 h
sérum + procaine	0,72	0,66	0,21
sérum + acide pab.	0,21	—	0,22
sérum + eau 1 ml	0,05	0,05	0,06
procaine + 1 ml eau	0,66	0,65	—

Pour déterminer la densité optique du mélange on prélève 0,1 ml qu'on dilue avec 5 ml de PO_4HNa_2 0,1 M et de l'eau q.s. pour 25 ml. La variation de la densité optique déterminée à 295 mμ, divisée avec $1,28 \cdot 10^4$ donne le nombre de molécules de procaine hydrolysées. Le tableau montre que la quantité relativement importante de procaine mise en contact avec 1 ml de sérum est complètement hydrolysée en 24 h.

L. ROBERT

Service de chimie, Faculté de Médecine, Université de Paris, le 28 avril 1955.

Summary

A method is proposed for dosage of serum procainesterase by differential spectrophotometry, based on the decrease of the optical density at 295 mμ in the course of the hydrolysis.

Agglutininbildung durch verschiedene Proteinfraktionen von *Salmonella ballerup*

Nukleoproteide aus verschiedenen Bakterienarten sind als antigene Substanzen mehrmals beschrieben worden¹. Es bestehen jedoch wenig quantitative Angaben über deren Antikörperbildungsvermögen, besonders bei gramnegativen Bakterien. Um ein Bild über die antigene Wirkung des sogenannten H- oder Eiweissantigens bei Salmonellen zu gewinnen, isolierten wir aus den lebenden Zellen des nicht pathogenen Stammes *S. ballerup* das Nukleoproteid auf möglichst schonende Weise. In unseren Versuchen arbeiteten wir nicht nur mit dem Nukleoproteid, sondern auch mit dessen Spaltprodukten, der Nukleinsäure und dem Nukleohiston.

Das Nukleoproteid wurde aus den frischen, 18 h alten und mit Glaspulver desintegrierten Bakterien mit alkalisiertem Wasser bei pH 8,4 extrahiert und mit Essigsäure bei pH 4,6 ausgefällt. Die Substanz wurde durch mehrmaliges Umfällen mit Essigsäure gereinigt und enthielt dann 14,4% N, 1,04% P und 5,1% Asche. Die Spaltung in Nukleinsäure und die Eiweisskomponente wurde durch zweistündiges Erwärmen in 0,5prozentiger Natriumkarbonatlösung bei 55° vollzogen. Den Proteinanteil entfernte man nach SEVAG, LACKMAN und SMOLENS² durch Ausschütteln mit Chloroform. Dieses Ausschütteln wurde so lange wiederholt, bis die Nukleinsäurelösung keine Spuren von Eiweiss mehr enthielt. Durch Zerlegen des entstandenen Chloroform-Proteingels mit Alkohol erhielt man den Proteinanteil, der durch mehrmaliges Auflösen bei pH 7 mittels Natronlauge, und Füllen mit Essigsäure bei pH 5,5 von der anhaftenden Nukleinsäure gereinigt wurde. Diese Substanz enthielt 15,3% N und 0,05% P. Sie gab eine negative Reaktion auf Pentosen, enthielt aber auch andere Kohlenhydrate. Die positive Reaktion auf Tyrosin sowie die negative Reaktion auf Tryptophan bedeutet, dass es sich um ein Histon handeln muss.

¹ O. T. AVERY und M. HEIDELBERGER, J. Exper. Med. 33, 81 (1923). – R. C. LANCEFIELD, J. Exper. Med. 42, 377 (1925). – A. K. BOOR und C. P. MILLER, J. Exper. Med. 59, 63 (1934). – M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938). E. MIKULASZEK, L. RZUCIDTO und H. WALECKI, Med. Doświadczalna Mikrobiol. 2, 323 (1950).

² M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938).

Aus der deproteinisierten Lösung erhielt man die Nukleinsäure durch Fällen mit Alkohol und reinigte durch mehrmaliges Umfällen. Die gereinigte Nukleinsäure enthielt 15,95 % N und 6,8 % P und gab eine positive Reaktion auf Desoxypentosen¹. Die Lösung zeigte eine starke Lichtabsorption im Ultraviolett (Max. bei 260 m μ) (Abb. 1).

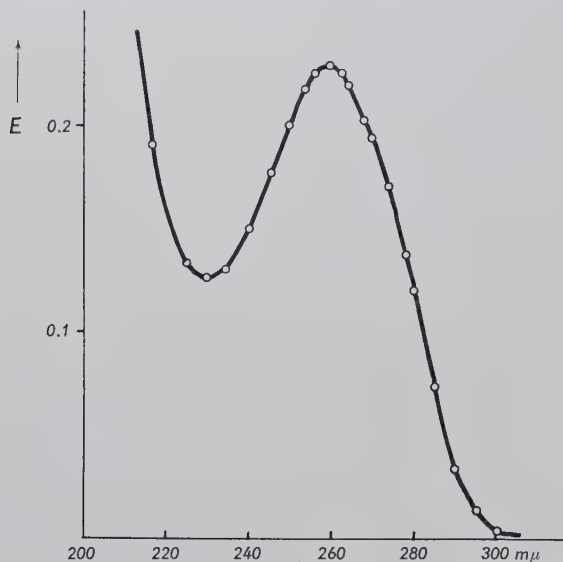


Abb. 1. Ultraviolettspektrum der gereinigten Nukleinsäure von *S. ballerup*. Konzentration 1 mg% in destilliertem Wasser bei pH 7.

Immune Sera wurden durch anfangs subkutane und später intravenöse Injektionen von insgesamt 4–8 mg Substanz in 10–12 Dosen an Kaninchen gewonnen. Die Dauer der Immunisierung war auf 3–4 Wochen bemessen. Als Vergleich dienten Sera, die durch Immunisierung von Kaninchen mit azetontrockenen Bakterien erhalten wurden. Die quantitative Bestimmung der Agglutinine wurde nach dem Verfahren von HEIDELBERGER und KABAT² ausgeführt, indem man 1 cm³

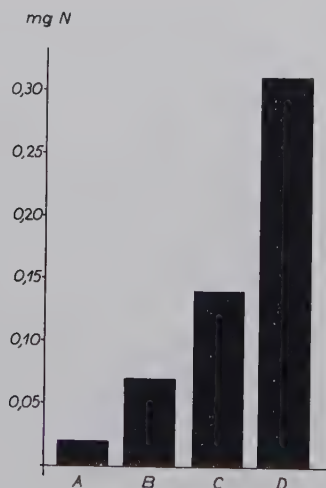


Abb. 2. Antikörperbildung durch verschiedene Proteinfractionen von *S. ballerup* in Milligramm Agglutinin-N ausgedrückt. A Nukleinsäure, B Nukleohiston, C Nukleoprotein, D ganze Bakterien. Die Werte der Kolonnen sind Mittelwerte von je 4 Versuchen.

¹ Z. DISCHE, Mikrochemie 8, 4 (1930); Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 55, 217 (1944).

² M. HEIDELBERGER und E. A. KABAT, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 31, 595 (1934); J. Exper. Med. 60, 643 (1934).

Serum mit steigenden Mengen einer standardisierten Suspension von *S. ballerup* agglutinierte, bis fast alle Antikörper an die zusammengeballten Bakterien gebunden waren. Der Agglutinin-Stickstoff wurde dann aus der Differenz im Stickstoffgehalte ermittelt. Es zeigte sich hierbei (siehe Abb. 2), dass die Nukleinsäure die schwächste und das intakte Nukleoprotein die stärkste antigene Wirkung unter den Stickstoffverbindungen besitzen. SEVAG und Mitarbeiter¹ erhielten durch Spaltung von Nukleoproteiden aus hämolytischen Streptokokken ebenfalls Nukleinsäuren, die bei der Immunisierung Antikörper erzeugen. Das vom Nukleoprotein abgespaltene Protein besitzt eine mittlere Aktivität. Die antigene Wirkung des Nukleoproteids wird demnach auf einer Zusammenwirkung der Nukleinsäure und der Proteinkomponente beruhen. Das Agglutininbildungsvermögen des Nukleoproteids wird immerhin von der Wirkung der ganzen Bakterien stark übertroffen, was wahrscheinlich eine Folge des anwesenden somatischen Antigens sein könnte. GUREVITCH und EPHRATI² untersuchten quantitativ die Bildung der Agglutinine bei den Kaninchen, die mit dem O-Antigen aus Typhusbakterien immunisiert wurden, fanden aber, dass diese nur 0,15 bis 0,17 mg N auf 1 cm³ Serum betragen.

S. ČMELIK

Zentralhygienisches Institut Zagreb, Jugoslawien, den 9. Mai 1955.

Summary

The author has examined the agglutinogenic property of nucleoprotein and its components, the nucleic acid and proteins from *S. ballerup*. The nucleoprotein was obtained by the extraction of fresh bacteria desintegrated by means of glass powder at pH 8.4 and precipitated with acetic acid at pH 4.6, and its components by splitting the nucleoprotein with 0.5 % sodium carbonate at pH 5.5. The protein component was separated from the nucleic acid by forming a chloroform-proteingel. The protein component was submitted to a further purification by dissolving at pH 7 and precipitating at pH 5.5. Rabbits to whom 4–8 mg of the substance were given in 10–12 doses were used for the immunization. The agglutinins were determined by HEIDELBERGER and KABAT's quantitative method with a *S. ballerup* suspension. The maximum quantity of agglutinin is shown in mg nitrogen per 1 cm³ of serum. In comparison with the results obtained by the immunization with whole germs, it follows that, by means of nitrogen compounds, the nucleoprotein has the most substantial agglutinogenic effect, and the nucleic acid the poorest one.

¹ M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN und J. SMOLENS, J. Biol. Chem. 124, 425 (1938).

² J. GUREVITCH und E. EPHRATI, J. Immunol. 55, 37 (1947).

Aktive und passive Immunisierung gegen heterologe Tumoren¹

Die Transplantation artfremder Tumoren gelingt nicht mit der üblichen Transplantationstechnik. Nach Vorbehandlung der Empfängertiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison wachen jedoch heterologe Tumoren während etwa 14 Tagen in beträchtlichem Masse weiter

¹ Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

(MURPHY¹, TOOLAN², BOLLAG und MEYER³ u.a.). Durch Röntgenbestrahlung und Cortison werden also Abwehrkräfte beeinträchtigt. Verschiedene Faktoren können für die Wachstumshemmung und Zerstörung des heterolog transplantierten Tumors verantwortlich sein: Die Verschiedenheit des Terrains mit seinen verschiedenen Nährstoffen, die natürliche Resistenz, die erworbene Immunität, Antikörperbildung und entzündliche, mesenchymale Reaktionen. Für die homologe Transplantation ist seit den klassischen Arbeiten von MEDAWAR⁴ und seiner Schule die überragende Bedeutung der erworbenen Immunität gesichert. Eigentliche Antikörper konnten allerdings bisher nicht nachgewiesen werden. (Zusammenfassende Darstellung siehe MEDAWAR⁴.) Hingegen stand es durchaus im Bereich der Möglichkeit, dass bei der heterologen Transplantation andere Faktoren eine zumindest zusätzliche Rolle spielten. Um diese Frage abzuklären, bedienten wir uns der aktiven und passiven Immunisierung gegen heterologe Tumoren, deren Wachstum durch Röntgenstrahlen oder Cortison ermöglicht wird. Diese Versuche sollten auch weitere Aufschlüsse über die Art des Einflusses von Röntgenstrahlen und Cortison auf die Abwehr heterologer Tumoren geben. BILLINGHAM, KROHN und MEDAWAR⁵ zeigten schon früher, dass Cortison die Überlebenszeit von homologen Hauttransplantaten verlängerte. Waren die Tiere jedoch durch eine erste Transplantation schon aktiv immunisiert, so hatte Cortison keinen Einfluss auf die Überlebenszeit des zweiten Transplantates. Cortison verzögerte die Bildung von Immunkörpern. Einmal gebildete Immunkörper übten aber ihre Wirkung trotz Cortison aus. Wir stellten bei der heterologen Tumortransplantation gleiche Verhältnisse fest. Wir erweiterten diese Resultate noch durch Versuche mit passiver Immunisierung bei mit Röntgenstrahlen und Cortison behandelten Tieren. Die passive Immunisierung führten wir nach der Methode von MITCHISON⁶ durch, der durch Implantation von Lymphdrüsen immunisierter Tiere die Transplantationsimmunität gegenüber homologen Tumoren übertragen konnte.

Methodik

A. *Aktive Immunisierung.* 35 g schweren Albino-Ratten wurden 1–2 mm³ grosse Stückchen von Mäuse-Crockersarkom S180 subkutan in die rechte Flanke implantiert. Nach 10 Tagen erfolgte eine zweite Implantation von Mäuse-Crockersarkom S180 in die linke Flanke. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung mit Röntgen-Ganzbestrahlung (2 × 150 r) oder Cortison (4 × 6 mg). Technik siehe BOLLAG und MEYER⁷. Als Kontrollen dienten Ratten, die den gleichen Tumor implantiert erhielten und auf gleiche Weise mit Röntgenstrahlen oder Cortison behandelt, aber 10 Tage vorher nicht mit dem Tumor S180 inokuliert worden waren.

B. *Passive Immunisierung.* 35 g schweren Albino-Ratten wurden in die rechte Flanke 1–2 mm³ grosse Stückchen des Mäuse-Crockersarkoms S180 subkutan inokuliert. Nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet und die axillären und inguinalen Lymphdrüsen der Seite, auf welcher der Tumor implantiert worden war, heraus-

präpariert. Die Lymphdrüsen von je 2 Tieren wurden, nach Zerkleinern mit einem Messer, 50 g schweren Ratten mit einem Troikart in die Bauchhöhle übertragen. Diese Ratten erhielten eine Behandlung mit Röntgen-Ganzbestrahlung (2 × 150 r) oder Cortison (4 × 6 mg). Ferner wurden ihnen am gleichen Tag der Lymphdrüsenübertragung 1–2 mm³ grosse Stückchen des Mäuse-Crockersarkoms S180 in die rechte Flanke subkutan implantiert. Als Kontrollen dienten 50 g schwere Ratten, denen Stückchen des gleichen Tumors übertragen wurden und die ebenfalls mit Röntgenstrahlen oder Cortison behandelt wurden. Einem Teil derselben wurden Lymphdrüsen von Normalratten implantiert. Die Tumoren wurden täglich gemessen. Als Mass der Tumorgrosse diente uns das Produkt aus den beiden grössten Durchmessern des Tumors.

Resultate. Die heterolog transplantierten Tumoren wuchsen nach der Behandlung der Tiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison zu beträchtlicher Grösse (= Kontrollen). Sowohl die aktive wie die passive Immunisierung verhinderten jedoch das Wachstum der heterolog transplantierten Tumoren weitgehend trotz analoger Behandlung mit Röntgenstrahlen bzw. Cortison (s. Tabelle). Die Implantation von Lymphdrüsen von Normaltieren beeinflusste das Tumorstadium nicht.

Durchschnittliche Tumorgrosse von je 5 auf gleiche Art behandelten Ratten zur Zeit ihres Maximums, das heisst 8–10 Tage nach der heterologen Implantation von Mäuse-Crockersarkom S180 auf Ratten.

	Tumorgrosse in mm ² (Länge × Breite)	
	Vorbehandlung mit Röntgenstrahlen	Vorbehandlung mit Cortison
Aktive Immunisierung . . .		
Aktiv immunisierte Tiere	14	4
Kontrolltiere	255	105
Passive Immunisierung . .		
Passiv immunisierte Tiere	28	38
Kontrolltiere	310	183

Die Resultate unserer vorliegenden Immunisierungsversuche lassen den Schluss zu, dass erworbene Immunkörper wahrscheinlich eine ausschlaggebende Rolle bei der Zerstörung von heterolog transplantierten Tumoren spielen. Auch Vorbehandlung der Wirtstiere mit Röntgenstrahlen oder Cortison vermögen in Anwesenheit von Immunkörpern kein heterologes Tumorstadium zu gewährleisten. Es ist deshalb anzunehmen, dass die unspezifische entzündliche Reaktion, die Bildung von Granulationsgewebe und die Bindegewebsformation, die ja durch Cortison und Röntgenstrahlen reduziert werden, keine primäre Bedeutung bei der Zerstörung des heterologen Tumors haben. In dieselbe Richtung weisen auch Versuche mit Butazolidin, einem sehr wirksamen Mittel zur Hemmung von Entzündungen. Es gelang uns nicht, damit das heterologe Tumorstadium zu ermöglichen¹. Ferner ist hervorzuheben, dass bei der heterologen Tumorstadiumimmunität Röntgenstrahlen und Cortison nur auf die Bildung von Immunkörpern einen hemmenden Einfluss haben. Bereits bestehende Immunkörper werden jedoch in ihrer Wirksamkeit nicht beeinträchtigt. Die natürliche Resistenz scheint, wenigstens bei unserem heterologen Transplantationssystem – Maus-

¹ J. B. MURPHY, J. Amer. med. Ass. 62, 1459 (1914).
² H. W. TOOLAN, Cancer Res. 13, 389 (1953).
³ W. BOLLAG und CL. MEYER, Oncologia 7, 66 (1954).
⁴ P. B. MEDAWAR, General problems of Immunity in Preservation and Transplantation of Normal Tissues (Churchill Ltd., London 1954).
⁵ R. E. BILLINGHAM, P. L. KROHN und P. B. MEDAWAR, Brit. med. J. 1, 1157 (1951); 2, 1049 (1951).
⁶ N. A. MITCHISON, Proc. Roy. Soc. B. 142, 72 (1954).
⁷ W. BOLLAG und CL. MEYER, Oncologia 7, 66 (1954).

¹ W. BOLLAG, unveröffentlichte Versuche.

tumor-Ratte – eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zum Schluss sei noch auf die passive Übertragung der heterologen Tumortransplantationsimmunität hingewiesen, die durch Implantation von Lymphdrüsen immunisierter Tiere erfolgen kann. Nur diejenigen Lymphdrüsen, die im Abzugsgebiet der subkutanen Tumoren liegen, haben einen immunisatorischen Effekt.

W. BOLLAG und H. R. MARTI

Medizinische Universitätsklinik, Zürich, den 29. Januar 1955.

Summary

Heterologous transplantation of tumors is made possible by pretreatment of the recipients with X-rays or Cortisone. Using the transplantation of the mouse Crocker sarcoma S180 on young rats, active or passive immunisations hinder the growth of these tumors even though the hosts were pretreated with Cortisone or X-rays. Acquired immune bodies seem to play a most important role in the destruction of heterologous tumors. Of minor significance are natural resistance, inflammatory reaction, formation of granulation and fibrous tissue. The influence of Cortisone and X-rays on heterologous tumor transplants consists in suppressing immune body formation. Once immune bodies are formed, Cortisone and X-rays have no effect on their action. Passive transfer of transplantation immunity was made by transplanting lymphnodes, draining the tumor implant.

Neurosecretion and Incretory Glands in a Tectibranch Mollusc

The presence of true incretory glands has—so far—been demonstrated clearly only in vertebrates and arthropods. When, in more recent years, the process of neurosecretion was detected, it was found to be closely connected to some of the incretory glands, mostly in such a way that certain brain cells produce the neurosecretory substance which, then, is transported to a special storage organ to which incretory activity is customarily ascribed.

The very close connection between neurosecretion and incretory activity in vertebrates as well as in arthropods makes it reasonable to make a search for some sort of incretory organs in other invertebrate groups, using the modern methods for selective staining of the neurosecretory granula. Already, a number of such investigations have demonstrated the presence of neurosecretory cells in the central ganglia of animals belonging to quite a number of different groups (SCHARRER¹).

During a study of the anatomy and histology of the tectibranch mollusc *Cylichna cylindracea* (Pennant), it became of interest to identify somewhat more precisely the position of the neurosecretory cells which, through the investigations of SCHARRER² and GABE³, have been shown to exist in several of the larger ganglia in tectibranchs. I am much indebted to M. THOMSEN for his valuable help in staining serial sections of two entire specimens of the said mollusc, using the Gomori chrome-haematoxyline-phloxin method.

¹ B. SCHARRER, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 24 (suppl.), 38 (1954).

² B. SCHARRER, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 15, 132 (1935); Naturwiss. 25, 131 (1937).

³ M. GABE, C. r. Acad. Sci. Paris 236, 2166 (1953); L'Année Biologique (3) 30, 44 (1954).

In most of the cells described by SCHARRER and by GABE as probably being neurosecretory, I found surprisingly few of the bluish-black staining granules. Nevertheless, many of these cells could be identified, partly by way of their large nuclei and the abundance of vacuoles in their vicinity, indicating a rich production of some substance, and partly by the strong affinity of the cytoplasm to the phloxin part of the stain. In many of the large nerve cells, and in quite a number of the smaller ones too, this red colour is quite distinct, in the axons as well as around the nuclei.

Later, my attention was drawn towards the peripheral nerves which came to stand out strikingly because of a content of dark-staining granules, arranged in the "pearl-strings" typical of neurosecretory pathways. A very strong contrast appeared between on one side the light colour of most of the ganglia and of the bases of the different nerves arising therefrom, and on the other side the blackish granulation which proved to be so very characteristic of the finer nerves, that it was possible to trace even the most minute branches (figs. 1 and 2). In specimens treated similarly, except that they had been stained in normal haematoxyline-erythrosine, this granulation never appeared.

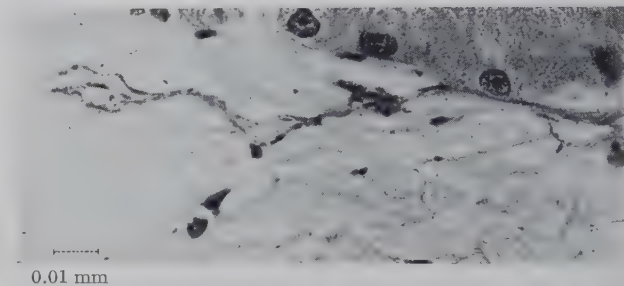


Fig. 1.—Neurosecretory granula in a tiny branch of the nervus anastomosis running below the prostate gland towards the epithelium of the lateral furrow on the head.

Often, in the stronger nerves, the granules are largely concentrated into a special layer closely inside the neurilemma. In the figure 2, two axons are seen to be given off, one from each of two branches of the nervus infrapallialis. Each of these axons runs to one of the large unicellular glands appearing as dark patches in the figure. Even these axons contain a rich supply of the dark granules. On one of the glands, the axon is seen ending at a cell in which the nucleus is surrounded by still more granules, probably representing an "end organ" transmitting the influence of the nerve to the gland.

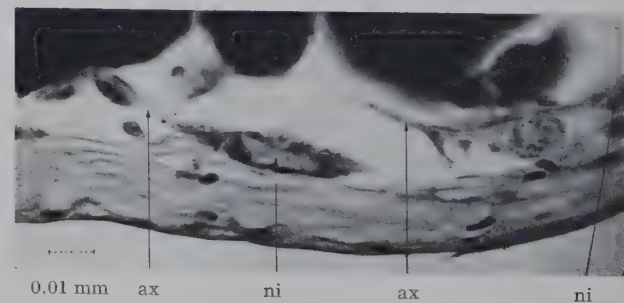


Fig. 2.—Innervation of two large subepithelial unicellular glands through single axons (ax.) arising from two branches of the nervus infrapallialis (ni.). The darker appearance of the periphery of the nerves is due to their content of bluish-blackish staining neurosecretory granules.

In spite of its very rich contents of dark-staining granules in the distal parts, the nervus infrapallialis does not show any amount of granula for a long distance proximally. As the same holds true in most other nerves, it appears necessary to suppose that neurosecretion is not solely a function of some few central ganglionic cells. Probably, a reasonable part of this activity is taken over by more peripheral cells. Possibly, this function is concentrated into the many granula-containing cells scattered along the periphery of most of the nerves, but the evidence for this assumption is not conclusive.

From the above it appears that, in the rather primitive mollusc *Cylichna*, histological indications of neurosecretory activity are not confined to special cells in the central nervous system, as in vertebrates and arthropods. This takes us to the basic problem whether neurosecretion should be regarded as a secondarily acquired mode of nervous activity—e.g. by transformation of extra-secretory cells to make them deliver their products directly to other cells or to storage organs. It may just as well be that neurosecretion is to be regarded as a primitive form of nervous activity, equal to and perhaps contemporary with the normal nervous stimulus. The evidence from the specialized groups of vertebrates and arthropods has been in favour of regarding neurosecretion as secondarily acquired, but the new observations on *Cylichna* seems to suggest that this is not the whole story. Studies on animals belonging to quite a number of more primitive invertebrate groups are much needed to elucidate these problems, and we are urgently in need of experiments on the functions of the neurosecretory substance in such animals.

Turning now to the question of incretory organs in molluscs, nothing has hitherto been known. However, owing to the correlation between neurosecretion and some of the incretory functions in vertebrates and arthropods, it may be supposed that neurosecretory granula could be used as a sort of tracer to find some of the incretory organs also in other groups of animals.

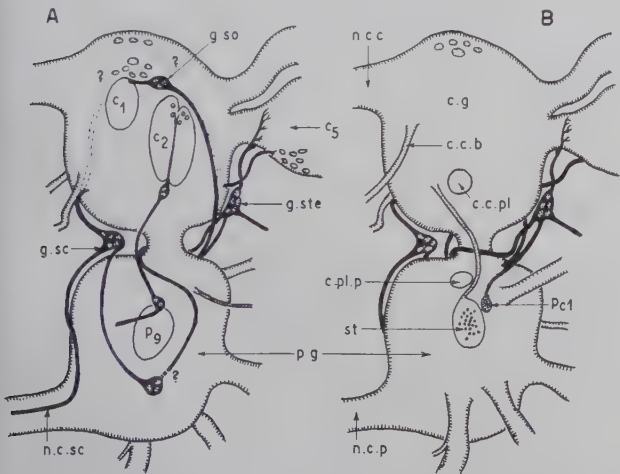


Fig. 3.—Diagrams of the neurosecretory pathways on the surface of the cerebral and pedal ganglia as seen (A) in frontal view (left side) and (B) from behind (right side). *c*₁) nervus oralis. *c*₂) n. labialis. *c*₅) n. tentacularis. *c.c.b.*) connectiva cerebrobuccalis. *c.c.pl.*) c. cerebropleuralis. *c.pl.p.*) c. pleuro-pedalis. *c.g.*) cerebral ganglion. *g.sc.*) ganglion subcerebrale. *g.so.*) g. suborale. *g. ste.*) g. subtentacular. *n.c.c.*) nervus commissuralis cerebralis. *n.c.p.*) n.c. pedalis. *n.c.sc.*) n. c. subcerebralis. *p.c1*) pedal *c*₁-cell. *p.g.*) nervus pedalis anterior. *p.g.*) pedal ganglion. *st.*) statocyste.

In the figure 3, a diagram is given of the central nervous system in *Cylichna*, showing the cerebral commissure (*n.c.c.*) which connects the two cerebral ganglia

above the pharynx (this last organ is not shown in the figure). Another, very tiny subcerebral commissure (*n.c.sc.*) connects the same two ganglia below the pharynx, enclosed into the neurilemma of the pedal commissure (*n.c.p.*). The cerebral as well as the pedal commissures are practically devoid of neurosecretory granula, whereas the subcerebral one proved to be easily recognizable by its darkness due to a rich supply of this substance. On each side, this tiny commissure was found to be inflated through the presence of 5–6 cells forming a diminutive ganglion which I have termed the subcerebral ganglion (*g.sc.*). It would be strange to believe that such a tiny extra connection between the two cerebral ganglia should be an invariable part of the nervous system in these molluscs, if it does not have a special function. No explanation has hitherto been produced, but it is tempting now to suppose some incretory function to be responsible for the arrangement.

Further, in the whole group of the Bullacea within the tectibranchs, some peculiar anastomoses are known to connect in a very constant way one of the pedal nerves to some of the sensory nerves of the cerebral ganglion. Now, a branch of this “nervus anastomosis” proved to contain another concentration of cells. This small ganglion has been termed the subtentacular ganglion (*g.ste.*) and it is as full of the dark granula as is the subcerebral one. The nerve continues from here into the base of the nervus tentacularis (*n_s*). Another branch of the nervus anastomosis was shown to contain a similar aggregation of cells, the suboral ganglion (*g.so.*) before joining the base of the nervus oralis (*c₁*). Quite a number of additional slender connectives have been found to run along the surface of the cerebral and the pedal ganglia, mostly enclosed in the perineurium, and connecting these small ganglia to each other and to some still smaller groups of similar cells. The whole system, as hitherto unraveled, is shown in figure 3. The detailed description will be published elsewhere. It is remarkable that one of the large, neurosecretory cells in the pedal ganglion (the *p.c1*-cell) sends out a strong axon running directly to the subtentacular ganglion described above. This is direct proof that there is a connection between the neurosecretory cells as described by SCHARER and by GABE (including the *p.c1*-cell), and the intricate neurosecretory pathways on the surface of the ganglia as here described.

At the same time, it is seen that, in the place just described, a situation exists which is a close parallel to what is known to be characteristic of neurosecretory cells in vertebrates and arthropods, namely the connection from a neurosecretory ganglionic cell to a small organ outside the ganglia, consisting of smaller cells between which the neurosecretory product is stored. At least one other similar system has been observed in *Cylichna*, too. The main nerve of the alimentary tract (the nervus gastro-oesophagealis) arises from the vicinity of the buccal ganglion. Close to the base of this nerve, it contains a group of 3–4 highly active neurosecretory cells, in all respects similar to those described by SCHARER from the central ganglia. A fortunate section has disclosed that, from the most active one of these cells, an axon runs to a group of smaller cells placed nearby, at the spot where the said nerve enters the wall of the oesophagus. The smaller cells appear similar to those constituting the subcerebral, the subtentacular, and the suboral ganglia. The whole system is another example of neurosecretory cells being connected to a storage organ formed by a group of smaller cells. In these storage organs, it could not be stated whether the neurosecre-

tory granula are placed inside or outside the cells proper but, from the experience at hand from vertebrates and arthropods, it appears probable that the granules are placed between the cells.

The evidence from these observations, therefore, points towards the existence of a rather intricate system of incretory glands in molluscs, although probably of a somewhat more diffuse character than those of the vertebrates and of the arthropods.

H. LEMCHE

Universitetets Zoologiske Museum København K., Danmark, April 4, 1955.

Zusammenfassung

Unter Anwendung der Gomorischen Chrom-Hämatoxylin-Phloxin-Färbung wird die Existenz neurosekretorischer Granula in den feineren und feinsten Nerven der tectibranchen Molluske *Cylichna cylindracea* (Pennant) nachgewiesen. Dazu kommt die Entdeckung einiger Verbindungen zwischen den vorher nachgewiesenen, zentral liegenden, neurosekretorischen Riesenzellen und einigen speziellen kleinen, vermutlich inkretorischen Organen, die nahe an der Oberfläche der zentralen Ganglien liegen, und die – untereinander mit einer ganzen Anzahl speziellen Nervenfasern verbunden – bei dieser Molluske einen ganzen Komplex von inkretorischen Organen zu bilden scheinen.

Zytologische Untersuchungen an der Reblaus-Blattgalle

Die meisten Pflanzengallen sind morphologisch und histologisch bereits gut untersucht. Dagegen liegen über deren Zytologie erst wenige Angaben vor¹.



Volumina von 2550 Zellkernen aus 25 Reblaus-Blattgallen an *Vitis Rup. St. GEORGES*. – Ordinate: Anzahl der Kerne in %; Abszisse: Volumina der Zellkerne in Messeinheiten. (Kerngrösstentyp 8, der etwa bei der Messeinheit 18–19 liegt, und Typ 9, der bis zur Messeinheit 40 reicht, sind im Säulendiagramm nicht mehr berücksichtigt.)

Bei zytologischen Untersuchungen an Blattgallen, die die Reblaus (*Dactylosphaera vitifoliae* SHIM.) an der Rebe (*Vitis*) hervorruft, konnte nun gefunden werden, dass das Wachstum der seit langem bekannten, abnorm

grossen Zellkerne im Gallgewebe zumeist nicht kontinuierlich erfolgt. Wie die Beobachtungen über die Häufigkeit verschiedener Zellkerngrössen an Gallen aller Entwicklungs- und Altersstadien ergaben, verläuft das Zellkernwachstum der sich entwickelnden Galle stufenweise. So findet man in jungen Gallen neben Zellkernen mit normalem Volumen im allgemeinen zwei oder auch drei weitere Kerntypen mit grösserem Volumen. Bei der vollkommen ausgebildeten Blattgalle können dann im Endstadium stets mindestens fünf, oft aber sieben oder acht solcher Kerngrössenklassen unterschieden werden, von denen jede im Säulendiagramm durch ein Maximum in Erscheinung tritt (siehe Abb.). Mit dieser stufenweisen Grössenzunahme ist aber das Wachstum der Gallzellkerne nicht in jedem Falle erschöpft, denn man findet bei sehr grossen Gallen stets eine kleine Anzahl von Zellkernen, die einem noch grösseren, neunten, in sich aber uneinheitlichen Grösstentyp angehören. Offenbar erfolgt das Wachstum derartiger Riesenkerns nicht mehr stufenweise, sondern kontinuierlich.

Wenn auch durch diese Befunde vorerst noch kein direkter Beweis erbracht werden konnte, so legen sie doch den Gedanken nahe, dass die Kerngrössenklassen in der Reblausgalle durch endomitotische oder endomitoseähnliche Vorgänge bedingt sind. Die Grössenklassen der Zellkerne aus dem Gallengewebe dürften dann vermutlich den Polyploidiegraden $2n$, $4n$, $8n$, $16n$, $32n$, $64n$, $128n$, und möglicherweise sogar $256n$ entsprechen, was mit den gefundenen Durchschnittswerten der einzelnen Gruppen recht gut übereinstimmen würde. Allerdings liegen keine einfachen Volumenverdoppelungen vor. Vielmehr sind die Verhältniswerte der kleinen Kerntypen grösser als einfache Verdoppelungswerte, diejenigen der grösseren Kerntypen dagegen kleiner. Die Verhältniszahlen der Kerngrössenklassen sind, wenn $2n = 1$ gesetzt wird, etwa folgende: 1; 3; 3; 9; 18; 27; 37; 50. Diese Befunde sprechen keineswegs gegen eine endomitotische Polyploidisierung. Ganz ähnliche Verhältniszahlen haben bereits TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA¹ bei nachweislich endomitotisch polyploiden Ruhekernen bestimmter pflanzlicher Haarzellen gefunden. Ausserdem wissen wir von polyploiden Pflanzen, dass deren Genomverdoppelungen so gut wie nie exakte Volumenverdoppelungen der Zellkerne zur Folge haben². Ferner spricht eine weitere Beobachtung für das Vorhandensein endomitotischer oder endomitoseähnlicher Vorgänge in der Reblausgalle. Man findet nämlich oft (besonders häufig bei grösseren Kerntypen und stets bei Riesenkernen mit einem geschätzten Polyploidiegrad von mehr als $256n$) prophaseähnliche Zustände, die den Chromomerenbau der Chromosomen deutlich erkennen lassen³. Es könnte dies so aufgefasst werden, dass der Schritt von einem Kerngrösstentyp zum nächsten im Verlaufe eines prophaseähnlichen Zwischenstadiums erfolgt.

Im allgemeinen folgt einer Volumenvergrösserung des Kernes immer eine entsprechende Zunahme des Zellvolumens. Dies gilt im grossen und ganzen auch für die Zellen in der Reblausgalle. Die Zellen in der Nähe der Einstichstelle des Parasiten verhalten sich jedoch abweichend. Sie bleiben relativ klein, obwohl gerade ihre

¹ E. TSCHERMAK-WOESS und G. HASITSCHKA, *Chromosoma* 5, 574 (1953).

² F. SCHWANITZ, *Züchter* 23, 17 (1953).

³ Bei bestimmten Zynipidengallen der Eiche scheinen die Dinge ganz ähnlich zu liegen. In diesen Gallen kommen ebenfalls abnorm grosse Zellkerne vor, in denen E. WOLL Strukturen beobachtete, die er als Anzeichen von endomitotischer Polyploidie auffasste (E. WOLL, *Z. Botanik* 42, 1 [1954]. – L. GEITLER, *Fortschr. Botanik* 16, 1 [1954]).

¹ E. KÜSTER, *Forsch. Fortschr.* 21/23, 143 (1947).

Kerne zu den grössten Typen mit den wahrscheinlich höchsten Polyploidiegraden zählen; die grössten, meist peripher zur Einstichstelle gelegenen Zellen der Galle besitzen also nicht die grössten Kerne, sondern stets solche mittlerer Grössenklassen.

Zellteilungen wurden bisher weder in jungem noch in älterem Gewebe der Reblausblattgalle gefunden. Sie dürften also für die Gallbildung sicherlich keine oder nur eine sehr untergeordnete Bedeutung haben. Jedenfalls reicht allein die vier- bis achtfache Volumenzunahme einer entsprechend grossen Anzahl in engem Verbände stehender Zellen der Blattspreite schon vollständig aus, um rein mechanisch zu einem derartig sackförmigen Gebilde von dem Ausmass einer Reblausblattgalle zu führen.

Zweifellos erklären die diskontinuierlichen Kern- und Zellvergrösserungen nicht das ganze Phänomen der Ausbildung einer Reblausgalle. Es darf aber vermutet werden, dass dieser Vorgang eine grundlegende Voraussetzung dazu ist. Dies ist um so mehr der Fall, als eine ganze Reihe morphologischer und physiologischer Eigentümlichkeiten der Galle – zum Beispiel der zerklüftete Habitus (entstanden durch Zerreibungen der unteren Epidermis infolge Gewebespannungen), die Sukkulenz, der erhöhte pH-Wert usw. – ganz zwanglos allein als Folge der Kern- und Zellvergrösserungen verstanden werden können. Soweit sich die Sachlage im Augenblick übersehen lässt, sind wir jedenfalls nicht dazu gezwungen, bei der Entstehung der Reblausblattgalle mit formativen Reizen rechnen zu müssen.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

F. ANDERS

Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen/Pfalz, den 29. April 1955.

Summary

Up to 9 types of cell nuclei, distinguished by their size, were found in the tissue of galls, which are produced by the vine louse. The growth of the cell nuclei probably proceeds in a series of prophase-like intermediate stages from one type of nuclei size to the next largest by means of endomitotic or endomitosis-like processes.

Die Grössenabhängigkeit der Herzfrequenz von Krebsen im Vergleich zu anderen Tiergruppen¹

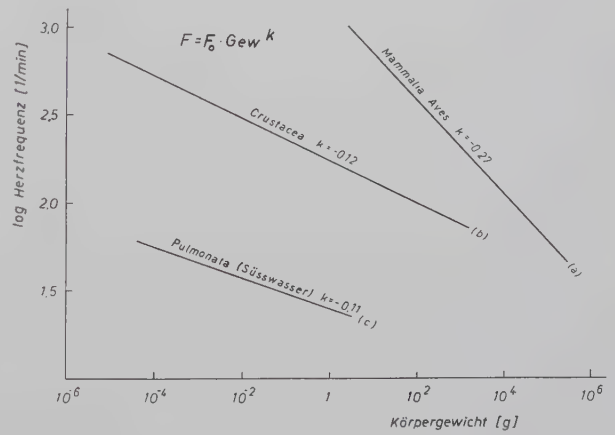
Über die Herzfrequenz der warmblütigen Wirbeltiere ist bekannt, dass sie in einer ähnlich strengen Weise vom Körpergewicht abhängt wie die Intensität des Stoffwechsels², die, gemessen zum Beispiel als relativer O₂-Verbrauch (cm³O₂/g/h) mit abnehmender Körpergrösse nach dem «Oberflächengesetz» steigt. Für die poikilothermen Vertebraten wird ein entsprechendes Verhalten vermutet. Qualitativ weiss man, dass auch unter den Wirbellosen die kleineren Tiere einen schnelleren Puls aufweisen als grössere Verwandte; eine exaktere

Formulierung hat bisher nur LUDWIG¹ an Süsswassermollusken versucht.

Die Krustazeen stellen einen Bautyp dar, der kreislaufmässig durch die festen äusseren Körperwände und die mehr oder weniger «offenen» Bahnen der Hämolymphe charakterisiert ist. Das Herz liegt oberflächlich dorsal, so dass sich an zahlreichen Arten, die einen Gewichtsbereich von 10⁻⁵ bis über 10³ g umspannen, mit verhältnismässig geringem methodischen Aufwand Pulsfrequenzen (l/min) ermitteln lassen. Bei kleinsten Tieren ist die Schlagfolge so schnell, dass die einfache Beobachtung mit der Stoppuhr durch eine stroboskopische Methode kontrolliert werden muss. Bei grossen, nicht durchsichtigen Arten wird, ohne Eröffnung des Kreislaufsystems, über dem Herzen ein kleines Stück Schale entfernt, so dass die Pulsationen des unterliegenden Epithels sichtbar werden. Die ungefesselten, ruhenden Tiere werden im O₂-gesättigten Wasserbad nach mehrwöchiger Adaptation an 20–23°C bei verschiedenen Temperaturen untersucht und aus den Frequenz-Temperaturkurven die Pulszahl der Vergleichstemperatur (20°C) ermittelt (Tab.).

Bei graphischer Darstellung liegen die Pulszahlen (F) befriedigend geschlossen um die in der Abbildung angegebene Gerade (b), die der Gleichung $F = F_0 \cdot \text{Gew}^{-0,12}$ folgt; $F = 160/\text{min}$. Betrachtet man die in der Tabelle enthaltenen Grössenklassen innerhalb der einzelnen Arten für sich, so deckt sich die intraspezifische (Alters-) Abhängigkeit des Herzschlags vom Gewicht nicht mit der extraspezifischen (reinen Grössen-) Abhängigkeit; eine Erscheinung, die auch von Warmblütern bekannt ist und an anderer Stelle ausführlicher diskutiert wird².

Im übrigen bleibt, auch bei Berücksichtigung einer möglichen Streuung der Exponentialkonstanten zwischen – 0,1 und – 0,13 die Gerade (b) der für Vögel und Säuger (a) durchaus unähnlich.



Abhängigkeit der Herzfrequenz vom Körpergewicht bei a Warmblütern (nach CLARK³), b Krebsen, c Schnecken (nach LUDWIG¹ und Messungen des Verfassers).

Zwischen der Veränderung der Herzfrequenz und dem relativen O₂-Verbrauch der Krebse⁴ besteht ein ähnliches Verhältnis wie bei den Warmblütern; bei gra-

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und unter Benutzung des Arbeitsplatzes «Niedersachsen» an der Zoologischen Station Neapel.

² A. J. CLARK, *Comparative Physiology of the heart* (Cambridge 1927).

³ F. W. WEYMOUTH, V. E. CRISMON, H. HALL, S. BELDING und J. FIELD, *Physiol. Zool.* 17, 50 (1944).

⁴ W. LUDWIG, Z. vgl. Physiol. 24, 319 (1937).

⁵ J. SCHWARTZKOPFF, *Biol. Zbl.* 74, (1955) im Druck.

Herzfrequenzen verschieden schwerer Krebse bei 20°C
(Adaptationstemperatur 20–23°C)

Anzahl	Art	Gewicht g	Herzfrequenz 1/min
20	<i>Daphnia pulex</i>	$2,5 \cdot 10^{-5}$	486
16	<i>Daphnia pulex</i>	$2,4 \cdot 10^{-4}$	470
20	<i>Daphnia pulex</i>	$1,2 \cdot 10^{-3}$	444
10	<i>Daphnia pulex</i>	$8,0 \cdot 10^{-4}$	381
10	<i>Daphnia pulex</i>	$8,0 \cdot 10^{-4}$	418
7	<i>Daphnia pulex</i>	$8,0 \cdot 10^{-4}$	394
3	<i>Gammarus pulex</i>	$1,1 \cdot 10^{-3}$	339
12	<i>Gammarus pulex</i>	$3,5 \cdot 10^{-2}$	258
3	<i>Hyale camptonyx</i>	$2,0 \cdot 10^{-2}$	285
3	<i>Apherusa bispinosa</i>	$2,0 \cdot 10^{-2}$	335
	<i>Caprella spec.</i>	$4,0 \cdot 10^{-2}$	140
3	<i>Mysis Lamorn.</i>	$2,0 \cdot 10^{-2}$	285
3	Krebslarven	$2,0 \cdot 10^{-2}$	250
4	Krebslarven	$1,3 \cdot 10^{-2}$	276
10	<i>Asellus aquaticus</i>	$8,0 \cdot 10^{-4}$	310
14	<i>Asellus aquaticus</i>	$6,1 \cdot 10^{-3}$	242
17	<i>Asellus aquaticus</i>	$3,5 \cdot 10^{-2}$	177
5	<i>Hippolyte spec.</i>	$2,8 \cdot 10^{-2}$	216
15	<i>Alpheus dentipes</i>	$1,6 \cdot 10^{-1}$	181
4	<i>Lysmata seticaudata</i>	$5,6 \cdot 10^{-1}$	156
4	<i>Leander serratus</i>	$7,7 \cdot 10^{-1}$	146
7	<i>Pontonia custos</i>	$8,1 \cdot 10^{-1}$	167
8	<i>Calianassa subterranea</i>	1,8	136
12	<i>Potamobius astacus</i>	$3,0 \cdot 10$	100
1	<i>Eriphia spinifrons</i>	$7,5 \cdot 10$	90
8	<i>Maja verrucosa</i>	$7,9 \cdot 10$	100
6	<i>Dromia vulgaris</i>	$1,5 \cdot 10^2$	87
6	<i>Dromia vulgaris</i>	$2,5 \cdot 10^2$	64
	<i>Cancer pagurus</i>	$2,0 \cdot 10^2$	105
7	<i>Palinurus vulgaris</i>	$2,2 \cdot 10^2$	107
1	<i>Palinurus vulgaris</i>	$1,3 \cdot 10^3$	65
	<i>Homarus vulgaris</i>	$4,5 \cdot 10^2$	50
4	<i>Squilla mantis</i>	$2,7 \cdot 10$	90

phischer Darstellung (doppelt logarithmische Koordinaten) verläuft in beiden Fällen die Stoffwechsel-Gerade etwas steiler als die der Herzfrequenz. Hierin drückt sich aus, dass der Kreislaufmehrbedarf von kleiner werdenden Organismen nicht allein durch die steigende Herzfrequenz, sondern auch (Warmblüter¹) durch die Zunahme des relativen Herzgewichtes oder andere die Versorgung der Gewebe verbessernde Mittel gedeckt werden kann.

Unter den Wirbellosen liegt vergleichbares Material nur von Süßwasserschnecken vor (2 Arten²), aus dem sich nach entsprechender Umformung und Erweiterung durch eigene Messungen (4 weitere Arten) die Gerade (c) für Süßwasser-Pulmonaten ergibt. Zum Unterschied von den Krebsen fallen hier Alters- und Größenabhängigkeit des Herzschlages über einen Bereich von 5 Größenordnungen zusammen. An zwei Arten von Süßwassermuscheln² sowie zahlenmäßig ungenügenden eigenen Daten von Land- und Meeresschnecken wird praktisch der gleiche Anstiegswinkel (Exponentialkonstante – 0,10 bis – 0,12) gefunden.

Damit stimmen die Krustazeen und die untersuchten Mollusken im Grade der Größenabhängigkeit des Herzschlages nahezu überein; überraschenderweise, da die Herztätigkeit beider Gruppen sonst in wesentlichen physiologischen Erscheinungen differiert. Die Rhythmusentstehung ist bei den Krebsen neurogen, bei den Mol-

lusken myogen; entsprechend unterscheiden sich die Temperaturkoeffizienten (1,9 bzw. 2,5). Die starre Schale der Krebse verhindert den direkten Einfluss der Körperbewegungen auf die Blutzufuhr zum Herzen; diese modifizieren den Herzrhythmus nur indirekt über das Nervensystem¹. Bei den Mollusken hingegen wirken die Körperbewegungen unmittelbar hydromechanisch auf die Herztätigkeit zurück (und umgekehrt²), so dass zum Beispiel bei *Aplysia limacina* der Rhythmus der Schwimmbewegung und der des Herzens synchron verlaufen.

Ein anderer wesentlicher Unterschied liegt in der absoluten Höhe der Herzfrequenz, die durch die Pulszahl eines idealen Tieres von 1 g Gewicht bei 20°C gekennzeichnet wird (F_0 = «typische Frequenz»). Während die «typische Frequenz» bei Süß- und Salzwasserkrebsen gleicherweise rund 160/min beträgt, allenfalls für Arten mit langgestreckten Herzen (Stomatopoden, Isopoden, Amphipoden) ein wenig tiefer liegt, gewinnt bei den osmotisch ungeschützten Mollusken der Salzgehalt des Mediums einen entscheidenden Einfluss (aber anscheinend nicht auf die Größenabhängigkeit). Ionenmangel setzt im Süßwasser die Geschwindigkeit der Rhythmusbildung herab³. Land- und Meeresschnecken zeigen nach noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen «typische Frequenzen» von 60 bis 75/min gegenüber 30/min der Süßwasserpulmonaten. Die Muscheln er-

¹ A. J. CLARK, *Comparative Physiology of the heart* (Cambridge 1927).

² W. LUDWIG, Z. vgl. Physiol. 24, 319 (1937).

¹ J. SCHWARTZKOPFF, Biol. Zbl. 74 (1955), im Druck.

² J. SCHWARTZKOPFF, Z. vgl. Physiol. 36, 543 (1954).

³ R. L. C. PILGRIM, J. exp. Biol. 30, 297 (1953).

reichen jeweils etwas geringere Werte als die Schnecken des entsprechenden Biotops.

Gemeinsam scheint den beiden hier untersuchten Bautypen (Krustazeen – Mollusken ohne Cephalopoden) nur das offene Kreislaufsystem zu sein. Es wird daher als Arbeitshypothese angenommen, dass der gegenüber den Wirbeltieren geringere Grad der Abhängigkeit der Herzfrequenz von dem Körpergewicht eine fundamentale Eigenschaft der «offenen» Systeme sei. Der Unterschied zu den «geschlossenen» Systemen findet seinen quantitativen Ausdruck in den Exponentialkonstanten ($-0,12$ gegenüber $-0,27$ bei Warmblütern). Während der letzte Wert bei den Wirbeltieren im Zusammenhang mit dem «Oberflächengesetz» des Stoffwechsels physiologisch gedeutet werden kann, ist eine Ausdehnung dieses Gesetzes auf die Wirbellosen ohne Zwang nicht möglich. Welcher allgemein-physiologische Ablauf sich unter der Konstanten $-0,12$ verbirgt, kann bei dem derzeitigen lückenhaften Stand der Kenntnisse von der vegetativen Physiologie der Wirbellosen noch nicht präzisiert werden.

J. SCHWARTZKOPFF

Zoologisches Institut der Universität Göttingen, den 25. April 1955.

Summary

Pulse frequencies for several species of crayfish were collected over a range of body weight from 10^{-5} – 10^3 g. Pulse rate varies in crayfish as (body weight) $^{-0,12}$; the size of the animal therefore influences the pulse rate much less than in warm blooded vertebrata, but in the same degree as in some mollusca. It is supposed that the similarity between crayfish, snails and mussels is related to their open circulatory system.

Über die Funktion der Lorenzinischen Ampullen der Selachier

Im Jahre 1938 beschrieb SAND¹, dass bei thermischer Reizung der Lorenzinischen Ampullen des Rochens (*Raja*) afferente Impulse in den Nerven auftreten, dagegen nicht bei mechanischer Reizung. Die Ansicht, dass es sich um *Thermorezeptoren* handle, wurde von verschiedener Seite zunächst bezweifelt (vgl. DIJKGRAAF²), doch zeigten neuere Untersuchungen der afferenten Impulse aus den Thermorezeptoren der Warmblüter (zusammenfassende Darstellung bei HENSEL³, ferner ZOTTERMAN⁴ und HENSEL⁵) erstaunliche Ähnlichkeiten der Erregungsgesetze von Kälterezeptoren und Lorenzinischen Ampullen. Eine genauere quantitative Untersuchung der letzteren erschien daher lohnenswert.

Material und Methodik

Die Versuche wurden an 40–50 cm grossen Katzenhaien (*Scyllium canicula* und *S. stellare*) ausgeführt. Die Lorenzinischen Ampullen sind kleine, gallertgefüllte

Bläschen, die in traubenförmigen Bündeln unter der Haut des Kopfes liegen und durch lange gallertgefüllte Röhren mit der Hautoberfläche in Verbindung stehen. Jede Ampullengruppe ist in eine dünne, feste Bindegewebskapsel eingeschlossen. Am Grunde der Ampullen liegt ein einschichtiges Sinnesepithel, das durch dünne Äste des *N. facialis*, der auch die Seitenlinienorgane innerviert, versorgt wird. Besonders geeignet für Versuche ist die mandibulare Ampullengruppe, die in der Nähe des Mundwinkels liegt und etwa 15 Ampullen enthält (Abb. 1).



Abb. 1. Herauspräparierte mandibulare Gruppe von Lorenzinischen Ampullen (*Scyllium*). In der Bindegewebskapsel sieht man deutlich die einzelnen Ampullen. Rechts der afferente Nerv, links die abgeschnittenen Gallertröhren.

Versuche in situ. Nach Zerstörung des Zentralnervensystems wurde der Nerv der mandibularen Ampullengruppe freigelegt. Die Aktionspotentiale wurden vom ganzen Nerven oder einzelnen aufgesplitterten Ästen abgeleitet, mit einem Tönniesschen Differentialverstärker verstärkt und kathodenstrahloszillographisch registriert. Die thermischen Reize wurden mittels einer wasserdurchströmten Metallthermode teils auf die unverletzte Haut, teils auf die freigelegte Ampullengruppe nach Entfernung des benachbarten Seitenkanales appliziert. In einigen Versuchen wurde mit sehr feinen Thermoelementen die tatsächliche Temperaturbewegung in der Ampullengruppe registriert.

Versuche an isolierten Ampullen. Die mandibulare Ampullenkapsel mit einem 2–3 cm langen Nervenstück wurde vorsichtig herauspräpariert und in eine feuchte Kammer gebracht. Eine solche Präparation ist viele Stunden funktionsfähig. Zur thermischen Reizung lag die Ampullenkapsel auf einer Metallthermode, die mit Wasser von beliebiger Temperatur durchströmt werden konnte. Die Aktionspotentiale wurden entweder vom ganzen Nerven oder von Einzelfaserpräparationen abgeleitet, die unter dem Präpariermikroskop hergestellt wurden. Die Temperaturbewegungen wurden mit feinsten Thermoelementen auf der Thermode, im Zentrum der Ampullenkapsel und auf deren Oberfläche registriert.

Ergebnisse

Ampullen in situ. Bei einer konstanten Temperatur von etwa 20° beobachtet man eine ständige asynchrone Entladung aus den Ampullen. Bei wärmeren und kälteren Temperaturen nimmt die Frequenz der Impulse kontinuierlich ab und erreicht schliesslich den Wert Null.

¹ A. SAND, Proc. Roy. Soc. Lond. [B] 125, 524 (1938).
² S. DIJKGRAAF, Z. vgl. Physiol. 27, 587 (1940).
³ H. HENSEL, Erg. Physiol. 47, 166 (1952).
⁴ Y. ZOTTERMAN, Ann. Rev. Physiol. 15, 357 (1953).
⁵ H. HENSEL, Pflügers Arch. 256, 195 (1952).

Schnelle Kältesprünge rufen eine vorübergehende starke Erhöhung der Impulsfrequenz hervor, bei schnellen Wärmesprüngen beobachtet man eine spiegelbildlich verlaufende vorübergehende Hemmung der Entladung. Leichter Druck auf die Thermode oder leichte Berührung des Seitenkanals löst eine Salve grosser mechanosensibler Impulse aus. Die Temperaturbewegungen in den Ampullen bei äusseren Temperaturreizen an der intakten Haut sind sehr beträchtlich: nach 6 s erreicht die Temperatur in der Ampullengruppe 50 % eines äusseren rechteckigen Temperatursprunges, nach 14 s wird ein Wert von 80 % erreicht. Die Tiefenlage der Ampullen ist also sehr wohl mit einer Funktion als Thermorezeptoren vereinbar.

Isolierte Ampullen. Die Ergebnisse an den isolierten Ampullen stimmen mit den Befunden *in situ* überein, nur fehlen hier die mechanosensiblen Impulse völlig. Mechanische Reize, die eine deutliche Deformation der Ampullengruppe machen, bewirken keine Änderung der temperaturabhängigen Dauerentladung. Nur bei wiederholter und sehr grober mechanischer Reizung tritt manchmal plötzlich eine den Reiz lang überdauernde Entladung auf. Es handelt sich hier sicherlich um eine inadäquate Erregung im Sinne von «injury potentials».

Bei konstanter Temperatur liegt das Frequenzmaximum der Dauerentladung des ganzen Nerven bei etwa 19–21°; die Gesamtfrequenz erreicht hier 400/s und mehr. Im kälteren und wärmeren Temperaturbereich nimmt die Entladung kontinuierlich ab und hört bei Temperaturen von 3 bis 5° und von 28 bis 33° ganz auf.

Die Frequenz der Dauerentladung von *Einzelfasern* als Funktion der Temperatur zeigt Abbildung 2. Die Maxima streuen hier stärker als bei der Gesamtentladung, auch die Grösse des Frequenzmaximums ist ganz verschieden; der höchste an der Einzelfaser beobachtete Wert war 65/s. Die Hemmung der Entladung bei warmen und kalten Temperaturen ist völlig *reversibel*, wie überhaupt bei einwandfreien Präparationen einer bestimmten konstanten Temperatur stets dieselbe Dauerfrequenz entspricht, unabhängig davon, ob man von warmen nach kalten Temperaturen oder umgekehrt fortschreitet.

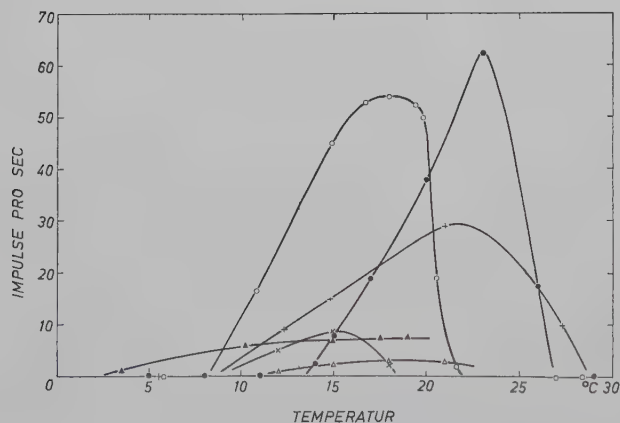


Abb. 2. Stationäre Impulsfrequenzen verschiedener Einzelfasern als Funktion der Temperatur. Isolierte Mandibularampullen von *Scyllium*.

Bei Temperaturänderungen spielt ausser der Temperatur auch der Zeitfaktor eine Rolle. Schnelle Abkühlungen führen zu einer überschüssigen Frequenzerhöhung (Abb. 3), die um so höhere Werte erreicht, je schneller die Temperaturänderung und je grösser der Kältesprung

ist. Schnelle Aufwärmungen bewirken eine vorübergehende Verminderung der Entladungsfrequenz, grössere Wärmesprünge eine völlige Hemmung, die das Spiegelbild der überschüssigen Erregung darstellt. Die Ampullen sprechen äusserst empfindlich auf Temperaturänderungen an; Abkühlungen von 0,05° können bereits eine deutliche Erhöhung der Impulsfrequenz bewirken. Die grösste Frequenzsteigerung bei Abkühlung erreicht an der Einzelfaser etwa 200/s.

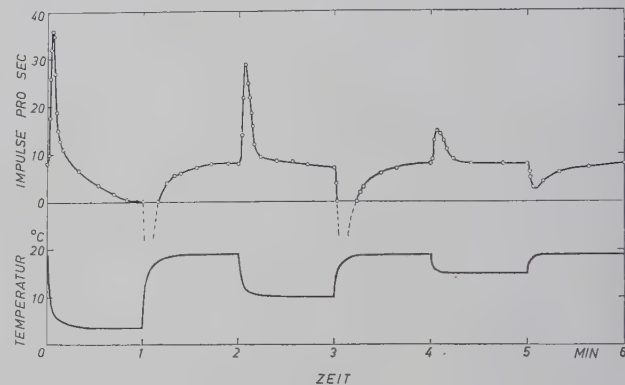


Abb. 3. Impulsfrequenz einer Einzelfaser der isolierten Mandibularampullen von *Scyllium* bei Temperatursprüngen.

Das Verhalten bei Temperatursprüngen, das dem eines «Kälterezeptors» entspricht, ist über den ganzen Temperaturbereich dasselbe, wogegen die Dauerentladung bei kalten Temperaturen einen *positiven* und bei warmen Temperaturen einen *negativen* Temperaturkoeffizienten hat (Abb. 4). Dabei sind auch in Temperaturbereichen, in denen keine Dauerentladung mehr stattfindet, durch Kältesprünge Entladungen auslösbar.

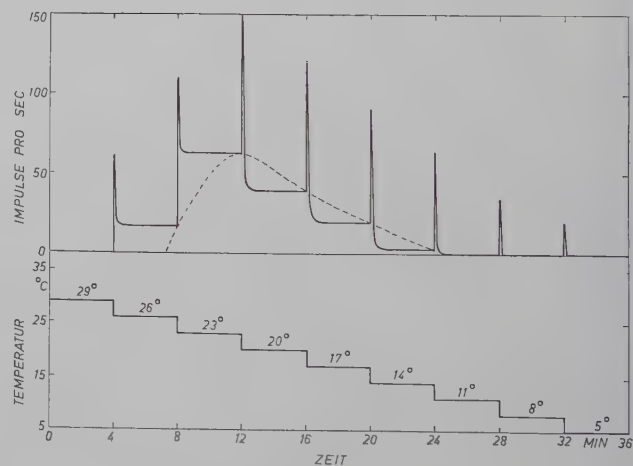


Abb. 4. Impulsfrequenz einer Einzelfaser der isolierten Mandibularampullen von *Scyllium* bei einer Stufenfolge von Kältesprüngen von 29° bis 5°. Die gestrichelte Kurve stellt das Verhalten der stationären Dauerentladung als Funktion der Temperatur dar.

Einzelne herauspräparierte Ampullen verhielten sich grundsätzlich ähnlich. Die Form der Impulse bei Abkühlung zeigte jedoch – im Gegensatz zu den typischen schnellen Spikes – einen mehr sinusförmigen Verlauf, dessen Ursache noch nicht geklärt ist.

Die Ergebnisse bestätigen die Befunde von SAND, dass die Lorenzinischen Ampullen äusserst thermosensibel, aber nicht mechanosensibel sind und dass sie ihre Ent-

ladungsfrequenz bei schnellen Abkühlungen erhöhen, bei schnellen Erwärmungen vermindern. Während SAND jedoch für die Dauerentladung nur einen positiven Temperaturkoeffizienten angibt, zeigen unsere Ergebnisse Kurven mit typischen Maxima. Die Lorenzinischen Ampullen verhalten sich somit in allen wesentlichen Punkten wie die Kälterezeptoren der Homoiothermen. Quantitativ sind die Ampullen sogar noch empfindlicher als die Kälterezeptoren der Warmblüter. Während die letzteren bei konstanten Temperaturen eine statische Unterschiedsempfindlichkeit von 2,5 und bei Temperatursprüngen eine dynamische Unterschiedsempfindlichkeit von 30 Impulsen/Grad erreichen, beträgt die Unterschiedsempfindlichkeit einiger Ampullen statisch 30 und dynamisch 90 Impulse/Grad.

Die Versuche wurden an der Zoologischen Station Neapel mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

H. HENSEL

*Physiologisches Institut der Universität Marburg (Lahn),
den 23. Mai 1955.*

Summary

The afferent impulses from the ampullae of LORENZINI of *Scyllium* show, both in the intact animal and in the isolated preparation, a steady discharge at constant temperature with a frequency reaching a maximum at an average of 20° and decreasing continuously at higher and lower temperatures. The discharge stops between 5° and 30° on the average. Rapid cooling causes a temporary rise in frequency, while rapid warming causes a temporary drop in frequency. While the ampullae are not sensitive to a mechanical stimulus, they react definitely to a change in temperature of 0.05°C. The ampullae thus behave like the cold receptors of the homoiotherms.

Untersuchungen über die Ursache der galvanotaktischen Reaktionen bei Fischen

Die Ansichten über die Ursache der Galvanotaxis gehen trotz der zahlreichen vorliegenden Arbeiten¹ noch weit auseinander. Bei den Knochenfischen wurde sie, insbesondere seit der zusammenfassenden Übersicht von SCHEMINSKY², mehr oder weniger als eine Vorstufe der Galvanonarkose aufgefasst; eine Beteiligung des Nervensystems galt als sicher. Im folgenden soll ein Beitrag zur Kausalanalyse des Phänomens geliefert werden.

Die Erscheinung selbst lässt sich kurz folgendermaßen umreißen: unter der Einwirkung eines elektrischen Feldes wird auf Grund koordinierter Aktivierung der Bewegungsorgane eine in bezug auf die Pole gerichtete Lokomotion herbeigeführt. Eine solche kommt bei den meisten Arten fast ausschliesslich durch alternierende Seitwärtsschläge von Rumpf und Schwanz zustande

(«Wriggsschwimmen»)¹, während sowohl paarige wie unpaare Flossen dann im wesentlichen nur als Steuerorgane dienen. Es war also naheliegend, dem Nervensystem hierbei eine entscheidende Rolle zuzuweisen, und fast sämtliche Versuche zur Lösung des Problems befassten sich mit einer Ausschaltung von bestimmten Rezeptoren, des Zentralnervensystems oder einzelner Teile desselben.

Im Verlaufe umfangreicher Ausschaltungsexperimente sowohl operativer wie pharmakologischer Art, wurden unsere Versuchstiere (Teleostier verschiedener Gattungen und Arten, insbesondere *Carassius auratus gibelio* L. und *Salmo irideus* W. GIBB.) auch mit Curare behandelt, um durch Blockierung der Endplatten eine Trennung der Muskulatur von ihrer motorischen Innervation herbeizuführen. Die Tiere erhielten 3 mg/kg Curare in die Rückenmuskulatur injiziert. Bei dieser Dosierung kommt es nach wenigen Minuten für die Dauer von 4 bis 6 Tagen zu einer vollständigen schlaffen Lähmung mit Sistieren der Atmungsbewegungen und Umfallen in Seitenlage. Die Atemlähmung hat bei den Fischen nicht die grosse Bedeutung wie bei den Warmblütern, da der Fisch einen wesentlichen Teil seines Sauerstoffbedarfs auch ohne aktive Atembewegung zu decken vermag. Nach der genannten Zeit erholen sich die Tiere vollständig. Die curarisierten Tiere zeigen bis zum Beginn der Restitution weder irgendwelche Spontanbewegungen, noch reagieren sie auf intensive Schmerzreize. Aus diesen Beobachtungen sowie aus der relativ langen Dauer des Zustandes der Bewegungslosigkeit darf unter Hinweis auf die üblichen Testverfahren der Schluss gezogen werden, dass es sich in den vorliegenden Fällen um eine vollständige Curarelähmung im oben angeführten Sinne handelt.

Prüft man ein solches Tier auf seine Reaktion in einem mit Gleichstromimpulsen durchströmten Becken, so zeigt es einwandfrei Zeichen einer Galvanotaxis, wenn auch in geringerem Ausmasse als ein intaktes Tier (Abb. 1a). Das grundsätzliche Erhaltenbleiben der Galvanotaxis nach Ausschalten jeder nervösen motorischen Funktion zeigt, dass bei den Knochenfischen der direkten elektrischen Muskeleerregbarkeit eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Nachdem so ein primärer Einfluss des Nervensystems auf die Galvanotaxis ausgeschlossen werden konnte, blieb die Frage zu klären, wie es dennoch zu einer gerichteten Lokomotion kommt. Hier bietet gerade die Betrachtung der curarevergifteten Tiere, bei denen Fluchtreaktionen, die eine Beobachtung sonst erschweren, ausfallen, guten Einblick. Beim Einschalten des Stromes kommt es immer zu einer Konkavkrümmung des Fisches zur Anode. Diese Reaktion erfolgt am heftigsten, wenn das Tier senkrecht zum elektrischen Feld orientiert ist. Hierin unterscheidet sich die galvanotaktische Reaktion deutlich von der Galvanonarkose, bei der die Schwelle am niedrigsten liegt, wenn das Tier parallel zu den Feldlinien steht (SCHEMINSKY und eigene Versuche). In einem solchen Idealfall – der wegen der technisch bedingten Schwierigkeit, einwandfrei homogene Felder im Versuchsbecken herzustellen, nur selten zu erreichen ist – kommt es bei einem Verlauf der Stromlinien parallel zur Längsachse des Tieres überhaupt zu keiner anodischen Lokomotion, sondern nach kurzem Zucken («erste Reaktion» nach SCHEMINSKY) unmittelbar zur Galvanonarkose oder zum galvanischen Krampf.

Im anderen Falle führt die ruckartige Krümmung des Fischkörpers, genau wie eine willkürlich intendierte

¹ FE. und FR. SCHEMINSKY, Tabul. Biol. 14, 2, 76 (1941). – J. LOEB und D. MAXWELL, Pflügers Arch. 63, 121 (1896). – J. BREUER, Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien Kl. III 114, 27 (1905). – A. v. HARREVELD, J. exp. Biol. 15, 197 (1938). – F. SCHIEMENZ, Z. Fischerei 1, 369 (1953). – O. KOEHLER, Bethé Handb. norm. path. Physiol. 11, 1, 1028 (1926).

² FE. und FR. SCHEMINSKY, Tabul. Biol. 14, 2, 76 (1941).

¹ H. BÖKER, Vergleichende Biologische Anatomie der Wirbeltiere II (G. Fischer, Jena 1935).

Wriggbewegung, zu einer Ortsveränderung, die zwangsläufig bogenförmig auf die Anode hin gerichtet ist. Beim curarisierten Tier erfolgt dann eine passive Streckung auf Grund der nach Aufhören eines Impulses eintretenden Muskeler schlaffung bis zur Geradestellung des Fisches; dadurch erklärt sich auch die Erscheinung, dass das Ausmass der galvanotaktischen Reaktion durch alle operativen oder pharmakologischen Massnahmen, die eine Willkürbewegung unmöglich machen, herabgesetzt wird.

Es zeigt sich somit, dass die Galvanotaxis bei Fischen durch eine unmittelbare Reizung der Muskulatur ausgelöst werden kann.

Das gesunde Tier lässt auf die durch den elektrischen Strom ausgelöste Zwangskrümmung eine willkürliche, entgegengesetzte Bewegung folgen, das heisst eine Schwimmbewegung nach der Gegenseite, wodurch die Fortbewegung zur Anode erheblich verstärkt wird (Abb. 1b). Welches die Ursache der kompensatorischen Gegenbewegung ist, die auch am Rückenmarkstier noch auftritt, muss vorerst offenbleiben; sei es, dass es sich um einen einfachen Reflex handelt, oder dass eine der vielfältigen höheren Koordinationsleistungen des Rückenmarks beim Fisch zugrunde liegt¹. Es kann nur soviel gesagt werden, dass nach Entfernung des Gehirns noch nervös korrelierte Bewegungen stattfinden, nach Entfernung des Rückenmarkes diese jedoch wegfallen.

Nicht selten erfolgt schon auf den ersten Reiz hin eine im Prinzip ungerichtete längere Fluchtbewegung, die nur deshalb zur Anode führt, weil dem Tier durch den ersten Impuls diese Richtung gegeben wurde (Abb. 1c).

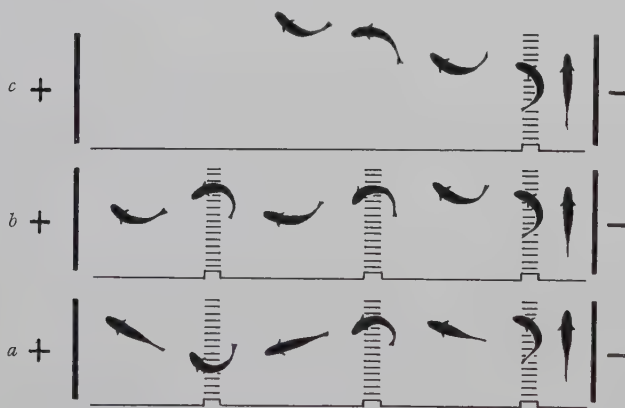


Abb. 1. Lokomotion primär senkrecht zum elektrischen Feld orientierter Fische. – a Galvanotaxis nach Trennung der Muskulatur von ihrer motorischen Innervierung durch Curare: Krümmung zur Anode bei den einzelnen Impulsen, dazwischen unwillkürliche Streckung bis zur Geradestellung. – b Galvanotaxis beim gesunden Fisch: nach anodischer Krümmung willkürliche Kompensationskrümmung nach der anderen Seite. – c Ungerichtete Fluchtbewegung beim gesunden Fisch nach erstem Impuls.

Das Ausmass der galvanotaktischen Reaktion ist am stärksten, wenn die induzierte Zwangsbewegung mit der physiologischen Schwimmbewegung zusammenfällt, das heisst, wenn der Fisch bei normaler Schwimmlage den Reiz von lateral erhält. Gerät ein Tier infolge Narkose oder Entstatung in Seitenlage, so kommt es beim Einschalten des Stromes zwar auch zu einer Krümmung des

Körpers, in diesem Falle nach ventral oder dorsal, doch kann diese aus anatomischen und bewegungsphysiologischen Gründen nicht zu einer Lokomotion führen, und es tritt dementsprechend keine Galvanotaxis auf.

Am deutlichsten ist diese Erscheinung an Plattfischen (*Trinecles maculatus* BLOCH) zu zeigen, bei denen die Drehung der dorso-ventralen Achse im Raum um 90° dazu führt, dass in einem Becken, in dem die Elektroden an den Seitenwänden angebracht sind, keine Galvanotaxis eintritt. Die Reaktion erfolgt aber sicher und bei den gleichen Stromdichten wie beim aufrecht schwimmenden Fisch gleicher Grösse, wenn die Elektroden oben und unten im Becken angebracht werden, das heisst, in bezug auf die Körperachse des Fisches also wieder bilateral angeordnet sind und damit auch wiederum die erzwungene Körperkrümmung mit der physiologischen Schwimmbewegung zusammenfällt (Abb. 2).

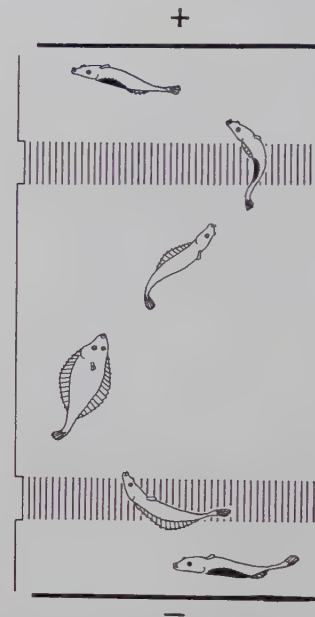


Abb. 2. Galvanotaxis bei Plattfischen: Anordnung des elektrischen Feldes senkrecht zur physiologischen Rücken-Bauch-Seite, das heisst zu den morphologischen Körperseiten.

Die Abhängigkeit der galvanotaktischen Reaktion von der direkten Reizung der physiologischen Lokomotionsorgane zeigt sich besonders deutlich bei der Testung eines *Tetradontis spec.* Die Lokomotion dieser Tiere erfolgt nicht wie sonst mit Hilfe der Rumpfmuskulatur, sondern ausschliesslich mittels der Brust-, Rücken- und Analflosse, während der Schwanz kaum noch als Steuerorgan dient. Dementsprechend kommt es bei diesen Tieren im elektrischen Feld zwar zu der beschriebenen Krümmung, in diesem Falle zur fast rechtwinkligen Abknickung des Schwanzes und der Schwanzwurzel, die aber auf die Ortsbewegung der Tiere ohne jeden Einfluss bleibt. So zeigen diese Fische, trotz der deutlich sichtbaren Wirkung des Stromes, keine Galvanotaxis, sie setzen vielmehr die für sie charakteristische Schwimmweise ungehindert fort.

Verwendet man als Reiz intermittierenden Gleichstrom wie in der Praxis der Elektrofischerei (DENZER¹), so wird die «anziehende» Wirkung der Anode mit der Anzahl der aufeinanderfolgenden Impulse und mithin

¹ E. v. HOLST, Z. vgl. Physiol. 20, 582 (1934); 21, 655 (1934). – U. EBERHARD, M. FABRIZIUS und E. v. HOLST, Z. vgl. Physiol. 26, 467 (1938). – S. DIJKGRAAF, Exper. 5, 291 (1949). – H. W. LISSMANN, J. exp. Biol. 23, 143 (1947). – W. v. BUDDENBROCK, Vergleichende Physiologie II (Birkhäuser, Basel 1953).

¹ H. W. DENZER, Arch. Fisch. Wiss. 1, 73 (1947).

der erzwungenen Lokomotionsbewegungen grösser, vorausgesetzt, dass der Impulsabstand gross genug bleibt, um zwischen zwei Impulsen eine kompensatorische Gegenbewegung zuzulassen. Dieser Zeitabstand schwankt mit Art und Grösse des Fisches, woraus sich auch die Beobachtung der «optimalen Fangfrequenzen» erklärt.

O. KUHN, J. SCHULZE und D. SPIEKER

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 23. Mai 1955.

Résumé

Nous avons pu montrer, en bloquant le système nerveux périphérique par une méthode opératoire ou au moyen de substances pharmacologiques (spécialement du curare), que la réaction de position typique des poissons aux champs électriques est déclenchée par une excitation directe des muscles correspondants. La réaction la plus forte s'observe lorsque l'axe sagittal des animaux est perpendiculaire à la direction du champ. Chez des animaux narcotisés ou privés du système vestibulaire, de même que chez les Soles et quelques autres poissons, les lignes de force du champ devraient donc être verticales pour déclencher une réaction galvanotactique semblable. Nous savons en effet par l'anatomie et par la physiologie des mouvements qu'aucune réaction galvanotactique ne peut résulter de contractions du ventre et du dos. Le «Tetrodon», dont la nage n'est pas commandée par les groupes musculaires du tronc, ne manifeste aucune réaction galvanotactique.

DISPUTANDUM

Die Augenstielbewegungen der Languste
(*Palinurus vulgaris*)

Im Zuge der in dieser Zeitschrift begonnenen Diskussion über die optomotorischen Reaktionen und die Unterscheidung aktiv und passiv bedingter Sinnesreizung haben v. BUDDENBROCK und Mitarbeiter darauf hingewiesen, dass *Carcinus maenas* auch bei aktiver, unbehinderter Spontandrehung um die Hochachse kompensatorische Augenstieldrehungen zeigt¹. Die Autoren bezeichnen diese Augenbewegungen als «optomotoric reactions» – also optisch ausgelöste Reaktionen –, obwohl sie gleichzeitig feststellen mussten, «dass ein Rest der kompensatorischen Bewegungen auch nach Blendung bzw. in homogener Umgebung bestehen bleibt»². Sie lassen es dahingestellt sein, ob dieser Rest auf nichtoptischer Reizung beruht (Erregung der Statocysten, Strömungsreize) oder aber intrazentral bedingt ist im von uns suggerierten Sinne³.

Beobachtung und Filmaufnahmen der Languste (*Palinurus vulgaris*) – ein für diese Zwecke durch Körpergrösse, ruhige Bewegungsweise und günstigere Lagerung der Augenstiele geradezu ideales Objekt – haben

unsere Erwartung einstweilen bestätigt. Ein und dasselbe Versuchstier wurde abwechselnd sehend und geblendet bei der Ausführung von Spontandrehungen um die Hochachse beobachtet und gefilmt (16-mm-Kodak-kamera). Die Blendung geschah mit Gummischlauchstückchen, die mit einem Korkstopfen verschlossen wurden (Abb. 1). Sowohl die Beobachtung des Tieres als die Auswertung der zahlreichen Filmaufnahmen (Fehlergrenze etwa 1 Winkelgrad) ergab beim sehenden und blinden Tier übereinstimmend *wesentlich gleiche kompensatorische Augenstielbewegungen*. Ein Beispiel für das Verhalten des blinden Tieres ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt; man sieht das charakteristische ruckweise Vorschnellen beider Augenstiele in der Drehrichtung und das Festhalten dieser Lage im Raum, während das Tier sich kontinuierlich weiterdreht. Die Kurve könnte ebensogut von einem sehenden Tier stammen. Das Ergebnis zeigt, dass die Augenstielbewegungen bei spontaner Drehung keine «optomotorische Reaktionen» sind¹.



Abb. 1. Blendung der Languste durch Aufstecken von Gummiröhrchen auf die Augenstiele und Verschluss mit Korkstopfen.

Es erhebt sich nun die Frage, ob die kompensatorischen Augenbewegungen des blinden Tieres etwa durch nichtoptische Reize ausgelöst werden. Dazu wurden die Augenstielbewegungen desselben Versuchstieres bei passiver Drehung um die Hochachse beobachtet und gefilmt, sowohl sehend als geblendet. Der Krebs befand sich dabei in einem runden Glasgefäss mit Seewasser auf der Drehscheibe. Während das sehende Tier ausnahmslos deutlich ausgeprägte kompensatorische Augenbewegungen (= optomotorische Reaktionen) zeigte, inklusive des ruckweisen «Nachhinkens» der Augen, blieben die Augenstiele beim geblendeten Tier in Ruhe, das heisst, sie machten die passiv auferlegte Körperdrehung in vollem Umfange mit. Hieraus lässt sich folgern, dass die Augenstielbewegungen des sehenden Krebses bei passiver Drehung entsprechend rein optisch ausgelöst werden und dass dem Tier kein Sinnesorgan für Drehung oder Wasserströmung zur Verfügung steht, dessen Reizung etwa die kompensatorischen Augenbewegungen bei aktiver Drehung erklären könnte.

An nichtoptischen Sinnesreizen käme somit nur mehr Erregung von Propriozeptoren bei Drehung des Rump-

¹ W. v. BUDDENBROCK und I. MOLLER-RACKE, Exper. 9, 191 (1953).

² W. v. BUDDENBROCK, I. MOLLER-RACKE und F. SCHALLER, Exper. 10, 333 (1954).

³ S. DIJKGRAAF, Exper. 9, 387 (1953).

¹ Die Ergebnisse wurden am 30. März 1955 auf der gemeinsam mit holländischen Biologen abgehaltenen 99. Tagung der Society for Experimental Biology in Groningen mitgeteilt und im Film vorgeführt.

fes in bezug auf die Beine in Betracht. Passive Reizung dieser Rezeptoren (Drehung des mit der Hand am Cephalothorax ergriffenen Tieres um die Hochachse, während die Beine Kontakt mit dem Untergrund haben) löste tatsächlich prompt entsprechende kompensatorische Augenstielbewegungen aus. Wir vermuten jedoch hier aus ähnlichen Gründen wie im Falle der optischen Reizung, dass diese Augenbewegungen bei aktiver Drehung *spontane Akte* intrazentralen Ursprungs sind. Für die *schnelle* Phase der Augenbewegung lässt sich letzteres sogar bestimmt behaupten, da sie der Drehung des Tieres häufig *vorangeht*.

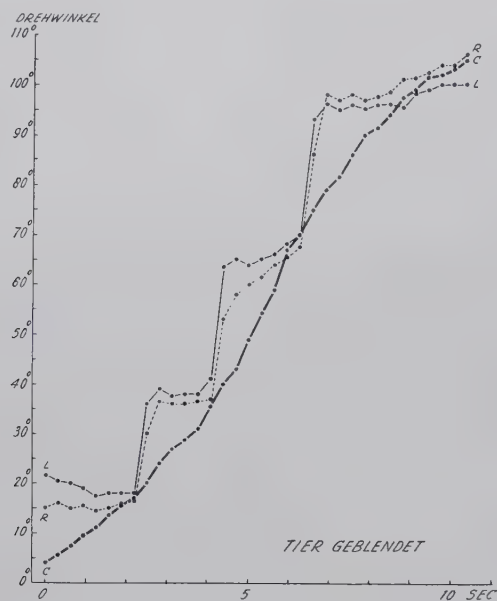


Abb. 2. Kompensatorische Augenstielbewegungen einer geblendeten Languste bei Spontandrehung um die Hochachse nach links um etwa 100°. Jedes 5. Filmbildchen wurde ausgemessen (Aufnahmegeschwindigkeit 16 Bildchen je Sekunde). – *Dicke Linie*: Drehung des Tieres (C = Cephalothorax); *punktierte bzw. dünne Linien*: rechter (R) und linker Augenstiel (L). – Zusammenfallen der C-Linie mit R oder L bedeutet, dass der Augenstiel in diesem Augenblick die (symmetrische) Normalstellung in bezug auf den Cephalothorax einnahm. Der schnelle Schlag der Augenstiele eilt der Rumpfdrehung in unserem Beispiel also jeweils voraus.

Zusammenfassend kann also geschlossen werden, dass die kompensatorischen Augenstielbewegungen der Languste bei Spontandrehung weder «optomotorische Reaktionen» sind, noch durch Rotation an sich oder Strömungsreize ausgelöst werden. Sofern es sich nicht um spontane Akte rein intrazentralen Ursprungs handelt, kämen als auslösende Sinnesreize nur noch Erregungen von Propriozeptoren bei Drehung des Rumpfes in bezug auf die Beine in Frage^{1,2}.

S. DIJKGRAAF

Institut für vergleichende Physiologie der Universität Utrecht, den 3. April 1955.

¹ Es ist klar, dass auch spontane, orientierte Augenbewegungen nur dann zu erwarten sind, wenn das Tier selbst sich in bezug auf die Umgebung irgendwie orientieren kann, etwa auf Grund taktiler und propriozeptiver Sinnesreize aus den Beinen. Das schließt aber nicht ein, dass auch die kompensatorischen Augenbewegungen direkt von diesen Sinnesreizen ausgelöst und reguliert werden.

² Zum gleichen Ergebnis führten – im Gegensatz zu v. BUDDENBROCK und Mitarbeitern – entsprechende Versuche mit *Carcinus maenas* (Anm. bei der Korr.).

Summary

Palinurus vulgaris shows clear compensatory eye stalk movements when turning actively around a vertical axis. Exactly the same eye stalk movements are observed after blinding of the animal (measurement of film pictures). On passive rotation only the intact animal shows compensatory eye stalk movements (= optomotoric reactions); in the blinded lobster such movements are lacking, except when a torsion of the body with respect to the legs is effectuated (stimulation of proprioceptors). It is suggested that the compensatory eye stalk movements of the actively turning *Palinurus* are no «optomotoric reactions», and possibly no sensory reactions at all; but that they are spontaneous acts originating primarily within the central nervous system.

Lauterzeugung und Schallwahrnehmung bei der Languste (*Palinurus vulgaris*)

Von zahlreichen dekapoden Krebsen ist bekannt, dass sie spezielle Stridulationsorgane besitzen, manchmal nur im männlichen Geschlecht. Auch wurde in vielen Fällen die Erzeugung charakteristischer Lautäußerungen wahrgenommen¹.

Besonders auffallend in dieser Beziehung ist die Languste, *Palinurus vulgaris*. Wohl jedem, der eine Languste ergreift, muss das laute Knarren auffallen, womit das Tier sowohl in der Luft als unter Wasser gegen die unerwünschte Fesselung protestiert². Es knarren sowohl ♂♂ als ♀♀. Langusten bringen derartige Laute gelegentlich auch untereinander hervor, wenn sie sich gegenseitig belästigen. Die Laute klingen etwa wie das Knarren von Leder bzw. einer verrosteten Türangel. Sie werden erzeugt, indem das (in einer vertikalen Ebene drehbare) basale Glied der Antenne auf- und rückwärts bewegt wird. Dabei gleitet ein kleiner, längsgefurchter Polster an der medialen Wand dieses Fühlergliedes (Abb. 1) über eine entsprechend gebogene, glatte Leitfläche an der lateralen Seite des Vorsprunges, der sich am Kopfpanser zwischen beiden Fühlern befindet (Abb. 2).

Der knarrende Ton entsteht, indem der Polster rhythmisch an der Gleitfläche haftet und verspringt, so dass er sich mit schnellen, kleinen Rucken fortbewegt, deren Frequenz die «Tonhöhe» des Knarrlautes bedingt. Man kann leicht ähnliche Laute erzeugen, wenn man den angefeuchteten Finger unter geeignetem Druck über eine Glasplatte gleiten lässt. Für nähere anatomische Einzelheiten sei auf die Beschreibungen des Schallapparates von MÖBIUS³ und besonders von PARKER⁴ verwiesen,

¹ Siehe u.a. H. BALSS, Naturwiss. Wochenschr. [N.F.] 49, 697 (1921). – Eine *Maja squinado* produzierte mehrmals täglich ein lautes, sonores Knurren durch Reibung der Mandibeln aneinander, auch ohne dass das Tier etwas zum Fressen hatte. Richtige Kaugeräusche und andere akzidentell erzeugte Laute treten bei den gepanzerten Krebsen selbstverständlich häufig auf. Nach P. VOLZ, Z. Morph. Ökol. Tiere 34, 272 (1938), wäre auch das laute «Knallen» der Alpheiden als akzidentell erzeugtes Geräusch aufzufassen, obwohl die Begründung dieser Auffassung nicht überzeugend ist.

² In Venedig heisst die Languste bezeichnenderweise «Grillo di mare».

³ K. MÖBIUS, Arch. Naturgesch. 33 (I. Bd.), 73 (1867).

⁴ T. J. PARKER, Proc. Zool. Soc. London 1878, 442.

der MÖBIUS' fehlerhafte Deutung berichtigte und gute Abbildungen bringt.

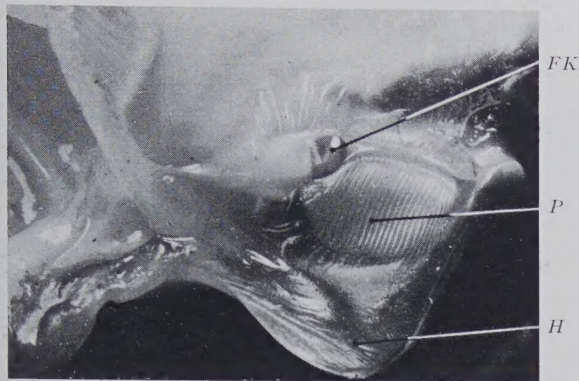


Abb. 1. Gefurchter Polster *P* am Basalglied der rechten Antenne von *Palinurus vulgaris*. Er wird bei der Tonerzeugung in Richtung der Furchen über die Gleitfläche am Kopfpanzer bewegt (unter Druck gegen dieselbe), wobei die frei vorstehende Hautfalte *H* vorangeht. *FK* Führungsknopf, der in einer seichten Rinne der Gleitfläche läuft.

Die Produktion der Langustenlaute legt den Schluss nahe, dass die Tiere diesen Schall auch wahrnehmen können. Soviel mir bekannt ist, ist jedoch bisher weder bei der Languste noch bei irgendeiner anderen Krebsart einwandfrei Schallempfindlichkeit festgestellt worden, es sei denn, man will die von HENSEN u.a.¹ dargebotenen Druckstöße und andere grobe Erschütterungen als Schallreize bezeichnen. Ich war daher überrascht, als

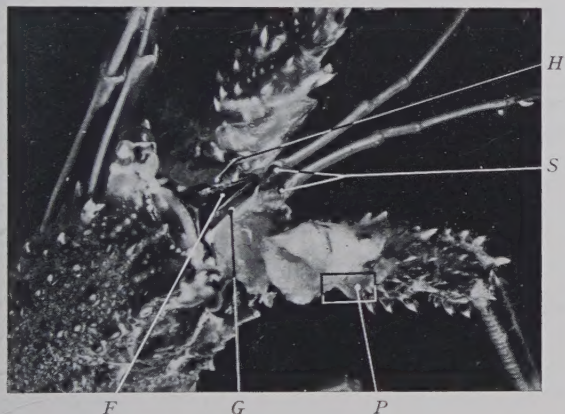


Abb. 2. Kopf der Languste, etwas schief von oben gesehen. Rechte Antenne im Basalgelenk gelöst und etwa 90° nach aussen umgeklappt. *P* Polster, in Abbildung 1 vergrößert wiedergegeben, *F* Fortsatz am Kopfpanzer, der rechts und links seitlich die Gleitflächen *G* trägt. Beim linken Fühler (*in situ*) sieht man die Hautfalte *H* dem Oberrand der Gleitfläche aufliegen. *S* Statocysten im Basalglied der Antennulae.

eine frisch gefangene Languste, die zu anderen, bereits eingewöhnten Artgenossen in ein Becken gesetzt worden war, schöne Schallreaktionen zeigte! Das Tier (ein ♂) war äusserst aufgeregt; es hatte eben erst einem sich nähernden ♀ mit den Mandibeln ein Bein zerquetscht, an dem es in wilder Erregung auf dem Rücken liegend noch weiterbiss, als es das ♀ längst autotomiert hatte. Bei Auseinandersetzungen mit anderen Beckeninsassen knarrte es auch wiederholt mit einem oder beiden Fühlern. Schliesslich sass es, immer noch aufgeregt, in seiner Ecke und drohte jedem, der ihm zu nahe kam.

Ich legte nun vorsichtig ein rundes Glas von aussen gegen die Seitenwand des Beckens (ein rechteckiger

Eternitbehälter von 60 × 100 cm, Wassertiefe 40 cm, Wanddicke etwa 12 mm) unterhalb der Wasseroberfläche und erzeugte mit dem angefeuchteten Finger einen dem Langustenknarrlaut ähnlichen Ton. Er wurde prompt durch eine «Schutzbewegung» der einen Antenne beantwortet (die Antennengeisseln hatte das Tier abgeworfen, es handelt sich also um Bewegungen des Antennenschaftes). Auch der zweite Ton löste sofort eine Antennenreaktion aus, und beim dritten Ton *antwortete das Tier* – ebenso prompt – *mit einem Knarrlaut*, der belustigend ähnlich klang! Optische Reizung spielte nicht mit; das Tier konnte nur meinen Kopf sehen, dessen Bewegungen keine Reaktionen hervorriefen. Die Schallreaktion konnte dann anscheinend beliebig oft hervorgerufen werden. Die Reaktionen bestanden immer in einer sofort erfolgenden Senk- oder Hebebewegung einer oder manchmal auch beider Antennenschafts, die zwischendurch nicht bewegt wurden; auch antwortete das Tier noch ein zweites Mal mit einem Knarrlaut.

Bei diesen Versuchen achtete ich besonders darauf, dass keine gröbere Erschütterung erzeugt wurde. Das schwere Becken stand unbeweglich aufgestellt; das Glas ruhte ebenfalls unbeweglich gegen die Beckenwand. Die Reaktionen erfolgten auch dann gleich gut, wenn der Finger ganz leicht am Glas entlang gestreift wurde, so dass seine Bewegung frei in der Luft begann und endete. Die Empfindlichkeit des Tieres war, besonders am Anfang, ganz erstaunlich. Die Tonhöhe ist bei dieser Art der Erzeugung von Fall zu Fall verschieden und schwer genau zu bestimmen; es wurden aber auch Töne beantwortet von wesentlich höherer Frequenz, als es dem Knarren der Langusten entsprach.

Da ich fürchtete, das Tier würde nicht lange akustisch reizbar bleiben – bei anderen Langusten bekam ich auf derartige Schallreize keine eindeutige Reaktionen –, entfernte ich ihm durch Abschneiden an der Basis beide Antennulen mit den Statocysten. Kurz nachher reagierte das Tier auf den Fingergleitton so gut wie zuvor. Die Schallwahrnehmung muss also mit anderen Sinnesorganen erfolgen.

Man könnte zunächst an taktile Reizung denken, etwa Wahrnehmung der Schallschwingungen des Beckenbodens. Leider konnte ich diese Möglichkeit nicht mehr experimentell prüfen. Denn die betreffende Languste reagierte am nächsten Tag zwar noch auf den Schall, aber viel weniger empfindlich und vor allem nicht mehr regelmässig, womit weitere Versuche zwecklos erschienen. Da aber in der Natur Übertragung der Knarrlaute durch Bodenschwingungen kaum in Frage kommt, halte ich es für wahrscheinlich, dass die Schallwahrnehmung direkt vom Wasser aus erfolgte. Ob man von einem Gehörsinn der Languste sprechen darf, hängt davon ab, ob sich in Zukunft *spezielle* Schallrezeptoren werden nachweisen lassen¹.

S. DIJKGRAAF²

Aus der Zoologischen Station Neapel, den 23. Mai 1955.

Summary

The sounds produced by the Spiny Lobster, *Palinurus vulgaris*, and their origin are briefly described. One animal reacted clearly to similar artificial sound stimuli, in some cases even "vocally". Elimination of both statocysts had no influence on these reactions.

¹ Anmerkung bei der Korrektur: R. LINDBERG, ein Schüler BULLOCKS, beobachtete bei Tauchversuchen im Freien Reaktionen amerikanischer Langusten der Art *Palinurus interruptus*, wenn ein in der Hand gefangengehaltenes Exemplar knarrte (briefl. Mitt. von Prof. BULLOCK; vgl. auch Exper. 9, 435 [1953]).

² Institut für vergleichende Physiologie der Universität Utrecht, Holland.

¹ V. HENSEN, Z. wiss. Zool. 13, 1 (1863).

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Biomathematics, the Principles of Mathematics for Students of Biological Science

By CEDRIC A. B. SMITH

712 pages

(Charles Griffin & Co., London, 1954)

(80/-)

Im Gegensatz zu ähnlichen Einführungen in die Mathematik für Nichtmathematiker bleibt C.A.B. SMITH nicht bei den einfachsten Verfahren stehen. Ausser den Elementen der Algebra, der Trigonometrie, der ebenen Geometrie, den Logarithmen, der Differential- und Integralrechnung behandelt er auch die Vektorrechnung, die komplexen Zahlen, das Auflösen von Systemen linearer Gleichungen, die Matrizenrechnung sowie Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik.

Diese mathematischen Methoden werden dem Leser in enger Beziehung zu den verschiedensten Problemen der Biologie dargebracht und auf die einleuchtendste Art verständlich gemacht. Der Biologe, welcher sich in mathematischer Richtung einarbeiten oder weiterbilden will, findet in SMITH einen sicheren Führer; das Werk kann ihm wegen seiner einfachen, klaren und anschaulichen Darstellung wärmstens empfohlen werden. Die vielen Beispiele werden den Biologen besonders ansprechen.

Wir möchten aber auch die Mathematiklehrer aller Stufen nachdrücklich auf diese Beispiele hinweisen, die geeignet wären, in vielen jüngeren und älteren Studierenden das Interesse an der Mathematik zu wecken und zu vertiefen.

A. LINDER

Lehrbuch der Pädiatrie

Von G. FANCONI und A. WALLGREN

3., neu bearbeitete Auflage. 965 Seiten.

(Verlag Benno Schwabe & Co., Basel 1954)

(Fr. 75.-)

Eine stattliche Zahl angesehener Pädiater verschiedener Länder hat sich zusammengefunden und ein Werk geschaffen, das man in der Kinderheilkunde nicht mehr

gut missen kann. Die ausserordentliche Leistung wurde dadurch erreicht, dass für die Bearbeitung der einzelnen Kapitel Spezialisten von häufig internationalem Ruf gewonnen werden konnten. Es würde zu weit führen, wenn der Referent auf die von den verschiedenen Autoren verfassten Abschnitte im einzelnen eingehen würde. Es sei nur zusammenfassend erwähnt, dass sämtliche Gebiete der normalen Entwicklung des Kindes wie die der Pathologie und Therapie in äusserer knapper Form, aber inhaltlich vollständig behandelt werden, so dass das vorliegende Lehrbuch für den Studenten der Medizin unentbehrlich, aber auch für den Arzt dienlich ist. In jeder Hinsicht erfolgte die Bearbeitung der verschiedenen Themen unter Berücksichtigung der modernsten Erkenntnisse. Als Beispiel hierfür sei nur vermerkt, dass in dem Abschnitt über die Ernährungsstörungen des Säuglings die in dem vergangenen Jahr sichergestellte Bedeutung der pathogenen Kolibazillen volle Berücksichtigung fand. Die früher vertretene Auffassung über die Indikationen der Bluttransfusion bei den durch Immunkörper bedingten Formen der hämolytischen Anämie ist revidiert worden und wird nicht mehr aufrecht gehalten. Drei Kapitel über die Pathologie des Kaliumstoffwechsels, des Eisenstoffwechsels sowie die Pathologie des Wachstums und der endokrinen Drüsen wurden neu aufgenommen. Auch der «Anhang» mit Zahlen über die Normalwerte des Serums, des Liquor cerebrospinalis und zahlreiche andere Daten, wie zum Beispiel der Medikamenten-Tagesdosis, ist so erweitert worden, dass der Abschnitt als neu zu bezeichnen ist. Aufmachung und Bebilderung des Werkes sind so vorzüglich, dass man es in Zusammenhang mit den andern Qualitäten des Lehrbuches versteht, warum das Werk seit 1950 drei Auflagen erlebte und in verschiedene Sprachen übersetzt wurde.

E. BERGER

Corrigendum

S. FALLAB und H. ERLNMEYER: *Kationengleichgewichte in biologischen Systemen*, Exper. 11, fasc. 5, 174 (1955.)

Auf Seite 175, linke Kolonne, Zeile 9 von oben muss es richtig heissen: «...eine Proteinkonzentration von $6,7 \cdot 10^{-4}$ » (anstatt $6,7 \cdot 10^{-2}$).

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acy lanid

Cedilanid

Digilanid

Scillaren

Strophosid



S A N D O Z A . G .

Neuerscheinungen und Neuauflagen

aus dem

VERLAG CHEMIE · WEINHEIM / BERGSTR.



Das Buch der großen Chemiker

Herausgegeben von GÜNTHER BUGGE unter Mitwirkung namhafter Gelehrter.

2 Bände mit 68 Biographien und einer Bibliographie. 1076 Seiten mit 146 Bildern auf Tafeln und im Text. Ganzleinen im Schutzkarton DM 80.—.

HANS FROMHERZ

Physikalisch-chemisches Rechnen in Wissenschaft und Praxis

Etwa 400 Seiten mit 40 Abbildungen. Ganzleinen etwa DM 35.—. Erscheint Ende 1955.

ERICH HECKER

Verteilungsverfahren im Laboratorium

1955. 229 Seiten mit 89 Abbildungen und 74 Tabellen im Text sowie einem Tabellenheft. Kartoniert DM 19.—.

F. A. HENGLEIN

Grundriß der Chemischen Technik

1955. 8., völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage. 762 Seiten mit 4 mehrfarbigen Tafeln, 460 Abbildungen und 223 Tabellen. Kunststoffeinfband DM 49.80.

KARL JASMUND

Die silicatischen Tonminerale

1955. 2., erweiterte Auflage. 192 Seiten mit 43 Abbildungen und 74 Tabellen. Kartoniert DM 17.60.

FRITZ MIETZSCH - ROBERT BEHNISCH

Therapeutisch verwendbare Sulfonamid- und Sulfonverbindungen

1955. 2., neubearbeitete und stark erweiterte Auflage. 200 Seiten mit 8 Tabellen und 1 Abbildung. Kartoniert DM 17.80.

LINUS PAULING

Chemie - eine Einführung

(General Chemistry)

Deutsch von F. Helfferich. Etwa 600 Seiten mit 200 Abbildungen. Ganzleinen etwa DM 26.—. Erscheint im Spätherbst 1955.

FRITZ SEEL

Grundlagen der analytischen Chemie und der Chemie in wäßrigen Systemen

1955. 348 Seiten mit 41 Abbildungen und 53 Tabellen. Kunststoffeinfband DM 29.—.

Silicium - Schwefel - Phosphate

Colloquium der Sektion für Anorganische Chemie der Internationalen Union für Reine und Angewandte Chemie. Münster i. W. vom 2. bis 6. September 1954. Text der Vorträge und Diskussionen. 1955. XII, 292 Seiten mit 138 Abbildungen und vielen Tabellen. Englische Broschur DM 24.—.

64 Seiten umfaßt der letzte, Ende März 1955 erschienene Katalog «Zeitschriften und Bücher» des Verlags Chemie. Auf Wunsch senden wir Ihnen diesen Katalog sowie ausführliche Prospekte über die einzelnen Bücher kostenlos zu.